

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 835 849

②1 N° d'enregistrement national : **02 01583**

⑤1 Int Cl⁷ : C 12 Q 1/68, C 12 N 15/29, 15/82, A 01 H 1/04, 5/00,
C 07 K 16/16, 14/415, C 07 H 21/00

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 08.02.02.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 15.08.03 Bulletin 03/33.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : GENOPLANTE-VALOR SAS Société
par actions simplifiée — FR.

⑦2 Inventeur(s) : CARANTA CAROLE, RUFFEL
SANDRINE, BENDAHDANE ABDELHAFID, PALLOIX
ALAIN et ROBIGLIA CHRISTOPHE.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : CABINET ORES.

⑤4 PROCÉDE DE SÉLECTION OU D'OBTENTION DE PLANTES RÉSISTANTES AUX POTYVIRUS ET
SÉQUENCES "MARQUANT" OU "CONFERANT" CETTE RÉSISTANCE.

⑤7 La présente invention concerne essentiellement un
procédé de sélection ou d'obtention de plantes résistantes
aux potyvirus qui consiste essentiellement à mettre en
œuvre au moins un moyen de sélection choisi dans le groupe
des outils génétiques (ou apparentés) comprenant :

A / tout ou partie d'une au moins des séquences sélectionnées dans le sous-groupe comportant :

- SEQ ID N° 1,
- SEQ ID N° 2,
- SEQ ID N° 3 et 4
- tout analogue de ces séquences résultant de la dégénérescence du code génétique,
- toute séquence d'ADNc complémentaire d'au moins l'une de ces séquences et/ou d'au moins un de leurs analogues;

. B / tout ou partie d'un au moins des produits de transcription des séquences A;

. C / tout ou partie d'un au moins des produits de traduction des séquences A;

. D / tout ou partie d'au moins un anticorps spécifique d'au moins un produit de traduction de C/;

. E / et toute association des outils A, B, C, D.

Le procédé est particulièrement applicable aux plantes

de la famille des solanacées, des cucurbitacées, des crucifères et des composées. L'invention comprend également les séquences permettant de conférer la résistance aux potyvirus et/ou de marquer les gènes de résistance ou de sensibilité à ces potyvirus.

FR 2 835 849 - A1



**Procédé de sélection ou d'obtention de plantes résistantes aux potyvirus et séquences
« marquant » ou « conférant » cette résistance**

La présente invention concerne un procédé de sélection ou d'obtention de plantes résistantes aux potyvirus. Le procédé est particulièrement applicable aux plantes de la
5 famille des solanacées, des cucurbitacées, des crucifères et des composées. L'invention comprend également les séquences permettant de conférer la résistance aux potyvirus et/ou de marquer les gènes de résistance ou de sensibilité à ces potyvirus.

Le groupe des potyvirus dont le membre type est le virus Y de la pomme de terre ou PVY
10 pour Potato Virus Y est le groupe de virus végétaux le plus important. En effet, les potyvirus sont capables d'infecter plus de 30 familles de plantes actuellement recensées. Ce groupe comprend au moins 180 membres ce qui correspond au tiers des virus de plantes actuellement connus.

La transmission des potyvirus est réalisée par les pucerons (par exemple, *Myzus persicae*)
15 selon le mode non-persistant. Les symptômes causés par les potyvirus sont des anomalies de coloration des feuilles (mosaïques, jaunissement des nervures), des déformations des feuilles, des nécroses nervaires pouvant conduire à la nécrose de la plante entière, et des réductions importantes de la taille de la plante malade influant fortement sur la productivité.

20 Les solanacées, cucurbitacées, crucifères et composées sont particulièrement sensibles aux potyvirus. Les solanacées et plus particulièrement la tomate et le piment (ou poivron) sont infectées par au moins sept potyvirus distincts à travers le monde : le virus Y de la pomme de terre (PVY) est présent sur l'ensemble des zones de culture alors que les autres sont cantonnés à un continent (Tobacco Etch virus, Pepper Mottle Virus et Perou Tomato Virus
25 sur le continent américain, Pepper Veinal Mottle Virus et Potyvirus E en Afrique, et Chili Veinal Mottle Virus en Asie). Cette compartimentation n'est cependant plus absolue, plusieurs potyvirus ayant été identifiés hors de leur zone d'origine. En France, et plus généralement dans le bassin méditerranéen, le potyvirus prédominant est le PVY. Apparues dans les années 70, les épidémies de PVY se sont développées dans les cultures
30 de plein champ puis dans les cultures sous abris où ont été mis en évidence, à partir de 1982, de nouveaux isolats de PVY causant des symptômes de nécrose particulièrement graves sur la tomate (Gebre-Selassie *et al.*, 1987). Pour certains de ces potyvirus, il est possible de classer les isolats selon leur aptitude à contourner des allèles de résistance. C'est le cas du PVY vis-à-vis du gène *pvr2* chez le piment, seul gène de résistance utilisé
35 de longue date par les sélectionneurs mais contourné dans les zones du pourtour méditerranéen et dans les zones tropicales. Malgré la prédominance du PVY en France, l'internationalisation du marché de la semence rend nécessaire l'utilisation de gènes contrôlant la résistance à ces différents potyvirus par les sélectionneurs qui vendent leurs

semences à l'étranger. Plus généralement, considérant l'importance économique des infections par potyvirus et l'absence de moyens directs de lutte contre ce type d'infection, la recherche de variétés végétales résistantes constitue un des axes principaux de l'amélioration des plantes.

5

Les potyvirus ont une structure filamenteuse non-enveloppée (Langenberg et Zhang, 1997) de 680 à 900 nm de long et de 11 à 15 nm de large (Dougherty et Carrington, 1988 ; Riechmann et al., 1992). Le génome viral est constitué d'un ARN simple brin sens d'une longueur approximative de 10 kb. L'ARN simple brin possède à son extrémité 3' une
10 queue poly A et se lie en 5' à une protéine virale appelée VPg (Murphy et al., 1990, Takahashi et al., 1997). L'ARN viral code pour 10 protéines impliquées dans le clivage des polyprotéines, la réplication du génome, le mouvement de cellule-à-cellule et le mouvement longue distance, la transmission par pucerons... La lutte contre les virus n'est réalisable qu'indirectement. En effet, il est seulement possible d'éliminer le vecteur de la
15 maladie (les pucerons dans ce cas) ou de cultiver des variétés résistantes à l'infection virale et/ou aux vecteurs.

Face à une agression par un pathogène (virus, bactéries, champignons ou nématodes), la plante possède plusieurs stratégies pour se défendre ou résister à l'infection.

20 Parmi les stratégies de défense, la plante peut mettre en place :

- des systèmes de défense mécaniques en élaborant et en renforçant des barrières physiques constituées d'une cuticule épaisse sur les feuilles et/ou d'un dépôt de callose ou de lignines sur les parois cellulaires. Ainsi, l'entrée et le mouvement des pathogènes dans la plante est rendue plus difficile.
- 25 - des systèmes de défense chimiques ou biochimiques en synthétisant des composés toxiques comme par exemple, les tanins, les phytoalexines et différents complexes protéiques.

Parmi les stratégies de résistance, on distingue la résistance non-hôte (lorsque toutes les
30 entités d'une espèce sont résistantes à un pathogène donné) de la résistance hôte (lorsque au moins une entité de l'espèce est sensible à une souche de l'agent pathogène).

La résistance hôte, la plus connue à ce jour et la mieux caractérisée, est celle faisant intervenir un gène majeur, dominant. Lorsque le gène majeur se trouve en présence d'un gène spécifique d'avirulence de l'agent pathogène, l'incompatibilité entre la plante et le
35 pathogène est mise en place et la plante est résistante. Cette interaction, décrite par Flor (1955) est également appelée "modèle gène-à-gène" et est très souvent associée à une nécrose localisée du tissu végétal au site d'infection (réaction d'hypersensibilité).

- Bien qu'assez largement répandu, ce modèle "gène-à-gène" n'est pas universel car certains systèmes de résistance décrits ne fonctionnent pas selon ce modèle, les différences résidant notamment dans le mode d'action du gène de résistance. Il existe des gènes récessifs, superdominants ou exerçant une dominance incomplète. Plusieurs gènes
- 5 d'avirulence peuvent interagir avec un même gène de résistance. De nombreuses résistances sont également polygéniques, plusieurs gènes présents dans la plante sont alors impliqués dans la résistance, chacun d'eux ayant un effet de protection partielle et pouvant contrôler des mécanismes différents.
- 10 A ce jour, de nombreux gènes dominants suivant le modèle "gène-à-gène" ont été clonés. Ils possèdent des structures géniques apparentées bien qu'ils agissent contre des agents pathogènes variés (virus, champignons, bactéries, insectes, nématodes). La présence de domaines conservés a permis de définir 4 grandes classes (Hammond-Kosack et Jones, 1997) de gènes dominants.
- 15 Singulièrement, on estime que 40% des résistances aux potyvirus sont récessives alors que dans les autres groupes viraux, cette proportion n'atteint que 20% en moyenne. Fraser (1992) a émis l'hypothèse que les résistances récessives seraient différentes des résistances dominantes de type "gène-à-gène" et résulteraient d'un déficit ou d'une altération
- 20 spécifique du produit d'un gène de l'hôte nécessaire à l'accomplissement du cycle viral dans la plante. Les allèles dominants de sensibilité correspondraient donc à la disponibilité de ce produit impliqué dans les interactions plante/pathogène.
- La protéine VPg des potyvirus joue un rôle prépondérant dans la réplication des potyvirus,
- 25 en interagissant avec un composant cellulaire nécessaire à la réplication, ce qui induit un contournement des résistances récessives. Cela n'exclut pas que d'autres gènes viraux puissent également intervenir. Ceci a été montré chez les couples TVMV/*Nicotiana tabacum* (gène *va*), PVY/tomate (gène *pot-1*), LMV/Laitue (gène *mo1*) et PSbMV/pois (gène *sbm1*), (Keller *et al.*, 1998, Morel, 2001, Redondo, 2001, Nicolas *et al.*, 1997).
- 30 Par ailleurs, Wittman *et al.* (1997) ont montré qu'une isoforme du facteur d'initiation de la traduction eucaryotique *eIF4E* d'*Arabidopsis thaliana* interagit avec la protéine virale VPg du virus de la mosaïque du navet (TuMV). Cette même interaction a été détectée entre la VPg du TEV et le *eIF4E* de tabac et de tomate (Schaad *et al.*, 2000).
- 35 Le gène *eIF4E* code pour un facteur eucaryotique d'initiation de la traduction des ARN. Le facteur de traduction *eIF4E* se fixe à la coiffe des ARNm au niveau des m⁷G. *eIF4E* correspond à une des sous-unités du facteur de traduction eIF4F (chez le germe de blé, il

correspond à la sous-unité p26). La structure de *eIF4E* se caractérise par une région riche en résidus tryptophane (10 chez *Arabidopsis thaliana*, 11 chez le blé et 12 chez les mammifères). Ces résidus tryptophane seraient impliqués dans la liaison au groupe fonctionnel m⁷G (Rudd, K. et al., 1998). Le facteur de traduction *eIF4E* est codé par une
5 famille multigénique. Par exemple chez *Arabidopsis thaliana*, 4 copies de *eIF4E* ont été identifiées (Rodriguez et al., 1998, Robaglia et coll., com. pers.). Ces copies présentent, deux à deux, entre 44 et 82% d'identité.

Tous ces travaux font état de la corrélation entre l'interaction *eIF4E* / VPg et la sensibilité
10 de la plante aux potyvirus; mais aucun ne souligne ni même ne suggère que cette interaction pourrait conduire à une résistance. Au contraire, il est même indiqué dans Schaad *et al.*, 2000 que l'interaction VPg / *eIF4E* ne joue pas de rôle dans la résistance, car les déterminants génétiques de l'interaction VPg / *eIF4E* sont distincts de ceux permettant aux potyvirus (*via* la VPg) de contourner la résistance.

15 Il est donc du mérite des inventeurs, dans un tel état de la technique, d'avoir mis en évidence des protéines *eIF4E* particulières, ainsi que les gènes correspondants, d'au moins deux types :

- un premier type déterminant une résistance récessive de leurs plantes hôtes aux
20 potyvirus,
- et un deuxième type déterminant une sensibilité dominante de leurs plantes hôtes aux potyvirus.

Partant de là, les inventeurs ont pourtant pu élaborer des outils génétiques (ou apparentés)
25 de criblage et/ou d'obtention de plantes sauvages ou mutantes, résistantes ou sensibles aux potyvirus.

D'où il s'ensuit que l'invention concerne tout d'abord un procédé de sélection de plantes
30 résistantes aux potyvirus caractérisé en ce qu'il consiste essentiellement à mettre en œuvre au moins un moyen de sélection choisi dans le groupe des outils génétiques (ou apparentés) comprenant :

- A / tout ou partie d'une au moins des séquences sélectionnées dans le sous-groupe comportant :
 - SEQ ID N° 1,
 - 35 - SEQ ID N° 2,
 - SEQ ID N° 3 et 4,
 - tout analogue de ces séquences résultant de la dégénérescence du code génétique,

- toute séquence d'ADNc complémentaire d'au moins l'une de ces séquences et/ou d'au moins un de leurs analogues;
- B / tout ou partie d'un au moins des produits de transcription des séquences A ;
- 5 • C / tout ou partie d'un au moins des produits de traduction des séquences A;
- D / tout ou partie d'au moins un anticorps spécifique d'au moins un produit de traduction de C/;
- E / et toute association des outils A,B,C,D.

10

Il est fait référence dans le présent exposé aux séquences SEQ ID N° 1 à 4 supra et à des séquences SEQ ID N° 1 à 20 infra. Toutes sont données dans la liste de séquences ci-après.

- 15 De préférence, les moyens de sélection sont sélectionnés parmi les sous-groupes d'outils A/ et/ou B/, et plus préférentiellement encore parmi le sous-groupe d'outils A/.

Par ce repérage simple, aisé et fiable de plantes résistantes ou sensibles aux potyvirus, les inventeurs ont ainsi mis au point un nouveau procédé s'appuyant sur l'utilisation de

- 20 séquences correspondant au gène *eIF4E*.

DESCRIPTION DETAILLEE

- 25 Le procédé objet de l'invention s'applique particulièrement aux solanacées, cucurbitacées, crucifères et composés et plus précisément aux plantes des genres *Lycopersicon*, *Capsicum*, *Nicotiana*, *Solanum*, *Lactuca*, *Cucumis*, *Arabidopsis* etc....

- Les potyvirus concernés sont, par exemple, le virus Y de la pomme de terre (PVY), au virus de la gravure du tabac (TEV) et/ou au virus de la mosaïque de la laitue (LMV), et/ou
30 au virus de la mosaïque jaune de la courgette (ZYMV) et/ou au virus de la mosaïque du navet (TuMV).

- Pour mettre en œuvre le procédé selon l'invention, on utilise des séquences nucléotidiques et/ou des séquences peptidiques ou des enzymes de restriction en tant que repères, sondes
35 ou amorces, pour sélectionner des plantes résistantes ou sensibles aux potyvirus.

On entend par « amorce » au sens de la présente invention toute séquence polynucléotidique permettant d'amplifier spécifiquement et uniquement une séquence co-

ségrégeant systématiquement avec l'allèle de résistance de la plante aux potyvirus obtenue à partir de toute ou partie des séquences, objet de l'invention.

- On entend par «sonde» au sens de la présente invention toute séquence polynucléotidique, voire polypeptidique, s'hybridant spécifiquement et uniquement avec une séquence co-
- 5 ségrégeant systématiquement avec l'allèle de résistance de la plante aux potyvirus obtenue à partir de toute ou partie des séquences, objet de l'invention.

Ces sondes et ces amorces peuvent être employées comme marqueurs spécifiques des plantes résistantes/sensibles aux potyvirus.

- 10 Conformément à l'invention, on est en mesure de faire le tri entre les plantes sensibles et les plantes résistantes aux potyvirus au moyen des outils génétiques (ou apparentés) (A) à (E), voire d'enzymes de restriction spécifiques. Ces dernières seront décrites infra.

- Les séquences (A) nucléotidiques SEQ ID N° 1 à 4 correspondent au gène *eIF4E* codant
- 15 pour un facteur eucaryotique d'initiation de la traduction des ARN.

La SEQ ID N° 4 correspond à un allèle récessif *eIF4E* de résistance à un potyvirus, tandis que SEQ ID N° 1 à 3 représente plutôt un allèle dominant *eIF4E* de sensibilité à un potyvirus.

- 20 Il a donc été découvert conformément à l'invention des moyens de sélection ou repères génétiques de résistance ou de sensibilité aux potyvirus.

Le procédé de sélection suivant l'invention peut faire intervenir séparément ou ensemble les deux types de moyens de sélection ou repères.

- 25 Par exemple, SEQ ID N° 1 et 2 peuvent provenir respectivement de tabac et de tomate et SEQ ID N° 3 & 4 de piment.

- Naturellement, l'invention englobe également tous les équivalents à ces séquences (A) nucléotidiques SEQ ID N° 1 à 4, qui conservent la fonction repère génétique *eIF4E* de
- 30 sensibilité/résistance aux potyvirus propres aux séquences de référence.

Pour ce qui concerne les ADN, il s'agit notamment des analogues de dégénérescence génétique et des séquences d'ADNc complémentaires des séquences de référence.

Les équivalents polynucléotidiques des séquences (A) de référence se trouvent également parmi leurs produits (ARN) de transcription (B) .

- 35 Les protéines (C) issues de (A) et de (B) constituent d'autres repères intracellulaires permettant la sélection de plantes résistantes ou sensibles aux potyvirus.

Outre les cibles (A), (B), (C), les moyens de sélection de l'invention peuvent aussi être des sondes nucléotidiques aptes à s'hybrider avec des cibles nucléotidiques (A) et (B)

complémentaires, ou bien encore des sondes protéiques (anticorps D) aptes à s'apparier avec des cibles antigéniques (C) spécifiques.

Il est envisageable de combiner tous ces moyens équivalents (A), (B), (C) & (D) pour former un outil de sélection (E).

5

Les moyens selon l'invention couvrent également tout fragment des séquences (A), (B), (C) & (D).

Par "fragment" on entend, selon l'invention:

- soit un polynucléotide d'au moins 10, 20, 30, 50, 100, 200, 300, 400, 500 nucléotides
10 contigus de la séquence de référence,
- soit un polyaminoacide d'au moins 3, 6, 10, 15, 30, 60, 100, 150, 200 aminoacides contigus de la séquence de référence. De préférence, ces fragments conservent la fonction de la séquence de référence.

15

Selon une modalité avantageuse de l'invention, le procédé est caractérisé en ce que

- on met en présence au moins une sonde comprenant au moins l'un des outils A,B,C,D,E selon la revendication 1 et/ou au moins une enzyme de restriction, avec au moins un extrait génomique et/ou protéique d'une plante à tester,
- on soumet ledit extrait génomique et/ou protéique, éventuellement apparié et/ou
20 hybridé et/ou digéré, à au moins une séparation,
- on révèle les éventuels appariements et/ou hybridations et/ou digestions susceptibles de se produire,
- et on procède à la lecture des résultats pour conclure finalement sur la présence ou l'absence d'un allèle de résistance (*pvr2^l*) ou d'un allèle de sensibilité (*pvr⁺*) à
25 au moins un potyvirus.

Ce procédé s'inscrit dans le cadre des méthodologies connues dans le domaine de la détection et de la reconnaissance de caractéristiques génétiques de végétaux.

- 30 Selon un premier mode de mise en œuvre du procédé, dans lequel le principe de sélection est fondé sur l'affinité des cibles pour une ou plusieurs enzymes de restriction spécifiques, le procédé peut répondre à la méthodologie suivante:

- on met en oeuvre l'ADN des plantes à étudier,
- on amplifie par PCR cet ADN, de préférence à l'aide des amorces
35 SEQ ID N° 17 et/ou 18,
- on digère cet ADN avec une enzyme de restriction appropriée, de préférence au moyen de l'enzyme telle que définie infra,
- on sépare les éventuels fragments obtenus,

- et on sélectionne les plantes résistantes ou sensibles selon leur profil de restriction.

L'ADN visé dans ce premier mode de mise en œuvre peut être soit de l'ADN total, soit de
5 l'ADNc, de préférence de l'ADN total.

Il va sans dire que les techniques de PCR, digestion enzymatique ou autre southern blot qui peuvent être ici utilisées, sont totalement à la portée de l'homme du métier.

Selon un deuxième mode de mise en œuvre du procédé, correspondant au cas où le mode
10 de sélection est l'hybridation de séquences nucléotidiques complémentaires, le procédé consiste de préférence à :

- à extraire l'ADN des plantes,
- à soumettre éventuellement cet ADN à une digestion enzymatique à l'aide d'au moins une enzyme de restriction,
- 15 - à dénaturer l'ADN éventuellement digéré,
- à mettre en présence l'ADN ainsi dénaturé, avec la sonde elle-même préalablement dénaturée et dotée d'au moins un marqueur, de façon à réaliser l'hybridation,
- à éliminer l'ADN et la sonde non hybridée,
- 20 - à révéler l'hybridation à l'aide du marqueur,
- et à sélectionner des plantes qui possèdent un profil d'hybridation correspondant à la co-ségrégation de la cible hybridée avec la sonde marquée et de l'allèle de résistance ou de sensibilité, la distinction entre les plantes sensibles et les plantes résistantes se faisant, de préférence, par la
- 25 différence de taille des fragments hybridés.

L'ADN visé dans ce deuxième mode de mise en œuvre peut être soit de l'ADN total, soit de l'ADNc, de préférence de l'ADN total.

Dans le cas où la sonde employée est spécifique de l'allèle de sensibilité aux potyvirus, la
30 mise en évidence de la caractéristique de résistance recherchée, se fait selon des techniques connues de contraste.

L'hybridation des molécules simple brin de la sonde et de la cible est effectuée dans des conditions plus ou moins stringentes. De préférence, les conditions d'hybridation stringentes permettant une hybridation sélective sont bien connues de l'homme du métier.

35 En général la température d'hybridation et de lavage est inférieure d'au moins 5°C au T_m de la séquence de référence à un pH donné et pour une force ionique donnée. Typiquement la température d'hybridation est d'au moins 30°C pour un polynucléotide de 15 à 50

nucléotides et d'au moins 60°C pour un polynucléotide de plus de 50 nucléotides. Voir notamment protocole de l'exemple 2 ci-après.

Avec une sonde marquée par exemple à l'aide d'un élément radioactif, tel que le ^{32}P , ou d'une enzyme greffée, telle que la peroxydase, l'hybridation est aisément révélée

5 qualitativement et quantitativement.

Selon un troisième mode de mise en œuvre (parmi d'autres) du procédé selon l'invention, correspondant au cas où le mode de sélection est l'appariement anticorps/antigène, le procédé consiste, de préférence, à détecter la présence d'un polypeptide en partie constitué

10 de tout ou partie d'une des séquences d'acides aminés décrites ci-dessous et incluses dans l'invention. Le procédé peut consister à mettre en contact l'échantillon à tester avec un anticorps tel que décrit ci-dessus puis à détecter le complexe antigène / anticorps formé.

Quel que soit le mode de sélection, le procédé de sélection selon l'invention est fiable et

15 sensible.

Selon un autre de ses aspects, l'invention concerne une séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle est décrite par une séquence choisie dans le groupe comprenant tout ou partie des séquences suivantes:

- 20 ♦ SEQ ID N° 1
- ♦ SEQ ID N° 2
- ♦ SEQ ID N° 3
- ♦ SEQ ID N° 4
- ♦ SEQ ID N° 17
- 25 ♦ SEQ ID N° 18.

La séquence nucléotidique SEQ ID N°1 est une séquence d'ADNc obtenue à partir l'ADN de tabac et correspondant au gène *eIF4E* de tabac qui comporte 669 paires de bases, dont 666 codent pour une protéine de 222 acides aminés.

30 La séquence nucléotidique SEQ ID N° 2 est une séquence connue d'ADN de tomate, dont le numéro d'accession est AF 259801 dans Genbank.

Les séquences SEQ ID N° 3 et 4 sont des séquences d'ADN codantes comprenant chacune 5 exons et obtenues à partir d'ADN de piment (*Capsicum annuum*), variétés Yolo Wonder et Yolo Y respectivement. Ces séquences sont constitués de 5 exons couverts par

35 l'invention dans leur ensemble ou individuellement.

Il est également question d'amorces dans le cadre de l'invention.

On distingue, de première part, les amorces d'amplification constituées par les séquences-amorces nucléotidiques SEQ ID n° 17 & 18, de deuxième part, les amorces de clonage SEQ ID N° 9 à 16, et, de troisième part, les amorces de criblage de banque BAC constituées par les séquences nucléotidiques SEQ ID n° 19 & 20.

5

Les SEQ ID NO 17 & 18 sont des amorces issues de la séquence codante de *eIF4E* du piment Yolo Wonder, permettant notamment par amplification PCR puis par digestion enzymatique, des séquences nucléotidiques porteuses la détection des allèles de résistance *pvr2* et de sensibilité *pvr*⁺ aux potyvirus.

10 Les amorces de clonage SEQ ID N° 9 & 10 dégénérées et les SEQ ID N° 11 à 16 non dégénérées, ont été définies sur un alignement des séquences de *eIF4E* de tabac, tomate et *Arabidopsis* et utilisées pour la synthèse (RACE) de sondes ADNc de détection d'*eIF4E* dans le génome de tomate et de piment.

les amorces SEQ ID N° 19 & 20 de criblage de banque BAC sont non dégénérées

15 Ces amorces SEQ ID N° 9 à 16, 19 & 20 pourraient éventuellement être utilisées directement ou indirectement (construction d'outils de sélection) dans la détection de caractéristiques de résistance ou de sensibilité aux potyvirus.

Toutes les séquences similaires à tout ou partie de ces séquences SEQ ID N° 1 à 20, c'est à
20 dire présentant une ou plusieurs modifications de séquence par rapport aux séquences de référence SEQ ID N° 1 à 20, font partie intégrante de l'invention. Les modifications qui distinguent ces séquences similaires des séquences de référence peuvent être des délétions, des additions ou des substitutions d'un ou plusieurs nucléotides de la séquence de référence. De manière avantageuse, le pourcentage de similarité est d'au moins 50 %, 25 mieux d'au moins 60%, encore mieux d'au moins 70%, plus spécialement d'au moins 80%, encore plus spécialement d'au moins 90%, et de préférence d'au moins 95% et plus préférentiellement d'au moins 98% par rapport à la séquence de référence.

Les méthodes de mesure de la similarité entre les séquences d'acides nucléiques sont bien
30 connues de l'homme du métier. On peut employer par exemple les programmes PILEUP ou BLAST (notamment Altschul *et al.*, 1993; Altschul *et al.*, 1990).

Une "séquence similaire" peut également se définir par sa capacité d'hybridation sélective à la séquence de référence en l'occurrence SEQ ID N° 1 à 20. Ainsi, l'invention comprend également les séquences qui s'hybrident avec la séquence de référence à un
35 niveau supérieur significatif par rapport au bruit de fond. Le niveau du signal généré par l'interaction entre la séquence capable de s'hybrider de manière sélective et les séquences de référence est généralement 10 fois, de préférence 100 fois plus intense que celui de l'interaction des autres séquences d'ADN générant le bruit de fond.

Les conditions d'hybridation stringentes permettant une hybridation sélective sont bien connues de l'homme du métier. En général la température d'hybridation et de lavage est inférieure d'au moins 5°C au T_m de la séquence de référence à un pH donné et pour une force ionique donnée. Typiquement la température d'hybridation est d'au moins 30°C pour
5 un polynucléotide de 15 à 50 nucléotides et d'au moins 60°C pour un polynucléotide de plus de 50 nucléotides. L'exemple 2 ci-après développe plus précisément le protocole d'hybridation utilisée par les inventeurs.

S'agissant des séquences codantes d'ADN, en particulier SEQ ID N° 3 & 4, la présente
10 invention vise également tout fragment de ces séquences et notamment les exons et les introns.

La présente invention couvre également les produits de traduction des séquences nucléotidiques SEQ ID N° 1,3 & 4, à savoir les séquences d'acides aminés choisies dans le
15 groupe comprenant tout ou partie des séquences suivantes:

- ♦ SEQ ID N° 5
- ♦ SEQ ID N° 6
- ♦ SEQ ID N° 7
- ♦ SEQ ID N° 8 .

20 Toutes les séquences similaires à ces séquences SEQ ID N° 5, 7 & 8, c'est à dire présentant une ou plusieurs modifications de séquence par rapport aux séquences de référence SEQ ID N° 5, 7 & 8, font partie intégrante de l'invention. Les modifications qui distinguent ces séquences similaires des séquences de référence peuvent être des délétions,
25 des additions ou des substitutions d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence de référence. De manière avantageuse, le pourcentage de similarité est d'au moins 40%, d'au moins 50%, d'au moins 60%, d'au moins 70%, d'au moins 80%, d'au moins 90%, de préférence d'au moins 95% et plus préférentiellement encore d'au moins 98% par rapport à la séquence de référence A/.

30 Les méthodes de mesure de la similarité entre les séquences d'acides aminés sont bien connues de l'homme du métier. On peut employer par exemple les programmes CLUSTALW ou ALIGNP (Thompson et al., 1994).

Les moyens de sélection *résistance / sensibilité* des plantes aux potyvirus, constitués par
35 des séquences d'acides aminés, sont de préférence utilisés comme cibles permettant le repérage. Il s'agit alors de moyens de sélection indirects qui sous-tendent la mise en œuvre de sondes spécifiques de ces cibles peptidiques. Ces sondes sont avantageusement des anticorps qui constituent un autre objet de la présente invention. Ainsi, lesdits anticorps

sont caractérisés en ce qu'ils sont spécifiquement dirigés contre tout ou partie d'un au moins des produits de traduction C, et plus particulièrement des séquences d'acides aminés SEQ ID N° 5 à 8.

Ces anticorps peuvent être monoclonaux ou polyclonaux.

5

Les anticorps contre les polypeptides tels que définis ci-dessus peuvent être préparés selon les techniques classiques bien connues de l'homme de métier (par exemple, Kohler et Milstein, 1975 ; Kozbor et al. 1983, Martineau et al., 1998). Un anticorps selon l'invention pourra comprendre un marqueur détectable isotopique ou non isotopique, par exemple
10 fluorescent, ou encore être couplé à une molécule telle que la biotine selon des techniques bien connues de l'homme de métier.

Un autre volet de l'invention a trait aux moyens de sélection formés par des sondes pour la détection de plantes résistantes à au moins un potyvirus, ces sondes étant prises en elles-
15 mêmes.

On définit dans ce volet des sondes pour la détection de plantes résistantes à au moins un potyvirus.

Une première catégorie de sondes est caractérisée en ce que chaque sonde comprend au
20 moins une séquence correspondant à tout ou partie des SEQ ID n° 1, 3, 4, 17 et 18.

Au sein de cette première catégorie, les sondes comprenant au moins une séquence correspondant à tout ou partie de SEQ ID n° 1, 3, 4 sont tout spécialement préférées.

Ces sondes sont utilisées pour distinguer les plantes résistantes et sensibles après digestion par une enzyme, de préférence l'enzyme *EcoRI*. La distinction entre les plantes sensibles
25 et les plantes résistantes se fait par la différence de taille des fragments hybridés.

Ces sondes sont à rapprocher du deuxième mode de mise en œuvre du procédé selon l'invention, tel que défini ci-dessus.

SEQ ID N° 3 est une sonde de sensibilité issue du piment Yolo Wonder. Elle se distingue
30 de SEQ ID N° 4, qui est une sonde de résistance issue du piment Yolo Y, par deux bases nucléotidiques. Ces mutations montrées sur SEQ ID N° 3 & 4, correspondent aux sites de restriction *TspRI* pour SEQ ID N° 3 et *MvuI* pour SEQ ID N° 4, marquant respectivement la sensibilité aux potyvirus dans Yolo Wonder et la résistance aux potyvirus dans Yolo Y.

35 Une seconde catégorie de sondes de ce premier groupe permet de réaliser un autre procédé de sélection conforme au premier mode de mise en œuvre du procédé selon l'invention, tel que défini ci-dessus. Selon ce premier mode, une amplification par PCR de la séquence eIF4E est tout d'abord effectuée. L'amplification est suivie d'une digestion sélective par

une enzyme de restriction. Les sondes qui interviennent sont donc de deux types : enzyme(s) de restriction et amorce(s) PCR permettant d'amplifier la séquence *eIF4E*.

Une telle sonde est caractérisée en ce qu'elle comprend:

- 5 ▪ au moins une enzyme de restriction, apte à réagir avec un site de restriction inclus dans une séquence nucléotidique codant pour le gène du facteur *eIF4E* ;
- et/ou au moins une séquence-amorce nucléotidique permettant d'amplifier cette séquence nucléotidique codant pour le gène du
- 10 facteur *eIF4E*.

Selon une première forme de réalisation de cette sonde, correspondant au cas où la séquence nucléotidique cible codant pour le gène du facteur *eIF4E* , est SEQ ID N° 3 :

- l' enzyme de restriction est *TspRI*, correspondant de préférence à
- 15 une séquence sens: NNCASTGNN[^] et antisens : [^]NNGTSACNN;
- et la séquence-amorce correspond à tout ou partie d'une séquence choisie dans le groupe comprenant :
- ♦ SEQ ID n° 17
- ♦ SEQ ID n° 18.

20 Cette sonde est révélatrice de la sensibilité de la plante testée aux potyvirus.

Selon une deuxième forme de réalisation de cette sonde, correspondant au cas où la séquence nucléotidique cible codant pour le gène du facteur *eIF4E* , est SEQ ID N°4 :

- l'enzyme de restriction est *MvnI*, correspondant de préférence à une
- 25 séquence sens : CG[^]CG et antisens : GC[^]GC;
- et la séquence-amorce correspond à tout ou partie d'une séquence choisie dans le groupe comprenant :
- ♦ SEQ ID n° 17
- ♦ SEQ ID n° 18.

30

Cette sonde est révélatrice de la résistance de la plante testée aux potyvirus.

Naturellement, l'invention vise également les isoschizomères de ces enzymes de restriction.

35

Les sondes enzymatiques *MvnI* et/ou *TspRI* de détection de la résistance aux potyvirus, sont celles qui sont préférées conformément à l'invention.

Une troisième catégorie de sondes de résistance est caractérisée en ce que chaque sonde comprend au moins un anticorps spécifique de tout ou partie de la séquence suivante SEQ ID N° 8.

- 5 L'invention concerne également des sondes de sensibilité aux potyvirus, constituées chacune par au moins une séquence d'acides aminés choisie dans le groupe comprenant tout ou partie des séquences suivantes :
- ♦ SEQ ID N° 5
 - ♦ SEQ ID N° 6
 - 10 ♦ SEQ ID N° 7
 - ♦ SEQ ID N° 8.

- De préférence, chaque sonde susvisée est pourvue d'au moins un marqueur, utile comme témoin de l'hybridation nucléotidique ou l'appariement antigène/anticorps au cœur de la
- 15 détection de la séquence sensible.

- Avantageusement, ce marqueur est détectable par moyens spectroscopiques, photochimiques, biochimiques, immunochimiques ou encore chimiques. Par exemple un tel marqueur peut consister en un isotope radioactif de ^{32}P , ^3H , en une molécule fluorescente (5-bromodéoxyuridine, fluorescéine, acétylaminofluorène) ou encore en un
- 20 ligand tel que la biotine.

- Concernant plus spécialement les sondes nucléotidiques, leur marquage est fait de préférence par incorporation de molécules marquées au sein des polynucléotides par extension d'amorces ou bien par ajout sur les extrémités 3' ou 5'.

- 25 De manière préférentielle, les séquences utilisées pour détecter les plantes résistantes aux potyvirus sont utilisées en tant que sonde ou amorce.

- Il va de soi que toutes les sondes susvisées ne sont pas limitées strictement aux séquences désignées, mais englobe tous les équivalents constitués notamment par les séquences
- 30 similaires conservant la fonction incriminée et telles que définies ci-dessus.

- L'homme du métier connaît parfaitement les différentes méthodes de préparation de sondes et d'amorces, y compris par clonage et par l'action d'enzymes de restriction, ou encore par synthèse chimique directe selon des techniques telles que la méthode au phosphodiester de Brown *et al.* (1979) ou la technique de support solide décrite dans le
- 35 brevet européen N° EP 0707592. Les acides nucléiques des séquences, particulièrement des séquences SEQ ID N° 1 à 4, objets de l'invention peuvent être marqués, si désiré, en incorporant une molécule ou un marqueur détectable comme exposé ci-dessus. Des

exemples de marquage non radio-actifs de fragments d'acides nucléiques sont décrits notamment dans le brevet français N° FR 78 10 975 ou encore dans les articles de Urdéa *et al.*, (1988) ou Sanchez-Pescador *et al.* (1988).

- 5 Selon un autre de ses aspects, la présente invention concerne l'utilisation des sondes définies ci-dessus pour la détection de plantes résistantes/ sensibles à au moins un potyvirus.

Conformément à l'invention, on met en œuvre en tant que repère(s) oligonucléotidique(s)
10 de résistance/sensibilité aux potyvirus, les sites de restriction *MvnI* et/ou *TspRI*, au demeurant connus, des séquences *eIF4E*.

De préférence, les sites de restriction utilisés comme repère(s) oligonucléotidique(s) correspondent :

- à la séquence sens : CG[^]CG et à la séquence antisens : GC[^]GC
- 15 • et/ou à la séquence sens: NNCASTGNN[^] et à la séquence antisens : [^]NNGTSACNN.

L'exploitation de ces sites de restriction comme repères (ou marques ou étiquettes) de résistance aux potyvirus sur des séquences exprimées, est à rapprocher du premier mode de mise en œuvre du procédé de détection sus-décrit, dans lequel on a recours à des sondes
20 enzymatiques de restriction (par exemple : *MvnI* et/ou *TspRI*) et à des amorces d'amplification de la séquence *eIF4E* , par exemple :SEQ ID NO 17 et/ou 18.

Eu égard à la spécificité des sites de restriction *MvnI* & *TspRI*, la présente invention englobe également l'utilisation comme repère(s) oligonucléotidique(s) de
25 résistance/sensibilité aux potyvirus, des susdits sites de restriction *MvnI* & *TspRI*, et, de préférence, du site de restriction correspondant à la séquence sens : CG[^]CG et à la séquence antisens : GC[^]GC et/ou du site de restriction correspondant à la séquence sens: NNCASTGNN[^] et à la séquence antisens : [^]NNGTSACNN.

30 Selon encore un autre de ses aspects, la présente invention concerne un kit de sélection de plantes résistantes/ sensibles aux potyvirus comprenant au moins une sonde de type anticorps ou polynucléotide telle que définie *supra*.

Le kit comprend le cas échéant les réactifs nécessaires à la réalisation d'une réaction d'hybridation ou d'amplification.

35

L'invention a également pour objet les plantes issues du procédé ci-dessus décrit et/ou de la mise en œuvre des outils et/ou de l'utilisation et/ou du kit de sélection définis ci-dessus.

De préférence, ces plantes appartiennent à la famille des solanacées, des cucurbitacées et des composées.

De manière encore plus préférée, elles sont choisies parmi les tomates, piments et/ou la laitue.

5

A titre d'exemple, les inventeurs réalisent le procédé objet de l'invention en suivant le protocole d'analyse RFLP (polymorphisme de longueur de fragments de restriction). Pour ce faire, les inventeurs ont utilisés un protocole classique de RFLP dans lequel les sondes objets de l'invention sont marquées au ^{32}P et dans lequel l'ADN des plantes de piment à analyser est digéré par l'enzyme de restriction *EcoRI*. A l'issue de ce procédé, les inventeurs obtiennent des profils d'hybridation différents entre les plantes résistantes aux potyvirus et les plantes sensibles, permettant ainsi de sélectionner les plantes sensibles ou résistantes. Ces dernières pourront ensuite entrer dans un programme d'amélioration des plantes par croisements successifs.

15

L'invention ne concerne pas seulement la sélection de plantes résistantes ou sensibles aux potyvirus. En effet, dans la mesure où les inventeurs ont pu identifier le gène *eIF4E* déterminant une résistance récessive aux potyvirus, il est désormais envisageable d'obtenir de nouvelles variétés de plantes génétiquement modifiées, résistantes (ou sensibles) à au moins un potyvirus.

20

L'invention concerne donc un procédé non biologique d'obtention de nouvelles variétés de plantes génétiquement modifiées, résistantes (ou sensibles) à au moins un potyvirus, caractérisé en ce qu'il consiste essentiellement à faire en sorte qu'apparaisse et/ou à introduire l'allèle de résistance *eIF4E* audit potyvirus dans le génome de ces plantes.

25

Selon un mode avantageux de mise en œuvre de ce procédé, l'apparition de l'allèle de résistance est provoquée par la mise en œuvre d'une méthode sélectionnée dans le groupe comprenant :

- mutagénèse, avantageusement "Tilling",
- recombinaison homologue,
- surexpression,
- insertion/délétion,
- "gene silencing" / transgénèse,
- et leurs combinaisons.

35

Les outils susceptibles d'être mis en œuvre dans le susdit procédé non biologique d'obtention font également partie intégrante de la présente invention.

Il en est tout d'abord ainsi de toute unité génétique construite caractérisée en ce qu'elle comprend :

- ♦ au moins un outil génétique A/ et/ou B/ tel que défini supra,
 - ♦ et/ou au moins une séquence nucléotidique choisie dans le groupe
- 5 comprenant tout ou partie des séquences suivantes :
- SEQ ID N° 1
 - SEQ ID N° 3
 - SEQ ID N° 4
 - SEQ ID N° 19
 - 10 • SEQ ID N° 20
- ♦ et/ou au moins une séquence nucléotidique codant pour le gène du facteur eIF4E et comprenant au moins un site de restriction *MvnI*, et/ou *TspRI*, et, de préférence, au moins un site de restriction correspondant à la séquence sens : CG[^]CG et à la séquence antisens : GC[^]GC et/ou un site de restriction
 - 15 correspondant à la séquence sens: NNCASTGNN[^] et à la séquence antisens : [^]NNGTSACNN.

Un autre outil de transformation génétique couvert par l'invention est constitué par tout vecteur de transformation de cellules végétales comportant au moins une unité génétique

20 construite telle que visée ci-dessus. Il peut s'agir de tout vecteur de clonage connu et approprié (phages / plasmides / cosmides.....).

Les cellules végétales et les microorganismes transformés au moyen d'au moins un vecteur ou d'au moins une unité génétique construite tels que définis supra, sont également visées

25 par l'invention.

A un niveau supérieur, l'invention englobe les plantes transformées au moyen d'au moins un vecteur et/ou d'au moins une unité génétique construite et/ou de cellules végétales transformées et/ou de microorganismes transformés, tels qu'ils ont été décrits ci-dessus.

30

L'homme du métier connaît bien toutes les techniques directes ou indirectes de modification génétique . Des détails complémentaires sont donnés dans les exemples qui suivent.

35 DESCRIPTION DES FIGURES

- La Figure 1 représente le gel issu d'une analyse par southern blot et montrant les différences de profils du marqueur *eIF4E* de résistance aux potyvirus, observées

pour différents piments sensibles ou résistants. L'ADN génomique de piment est digéré par l'enzyme *EcoRI* et hybridé avec le cDNA *eIF4E* de tabac – SEQ ID N° 1 – (exemple 3)

- 5 - La Figure 2 représente le gel southern blot montrant les amplifications PCR du gène *eIF4E* impliqué dans la résistance aux potyvirus chez le piment et met en évidence un site de restriction *MvnI* différentiel entre sensible et résistant. (exemple 4)

10 EXEMPLES :

Exemple 1 : Obtention des sondes tomate et piment

- 15 Les cDNA de tomate et de piment ont été obtenus par la technique de 3' et 5' RACE (System for Rapid Amplification of cDNA Ends commercialisé par la société Invitrogen TM) à partir de l'extraction d'ARN total de tomate et de piment et à l'aide d'amorces dégénérées définies sur un alignement des séquences de *eIF4E* de tabac, tomate et Arabidopsis.

- 20 La partie 3' du cDNA a été clonée par 3'RACE. Des amorces définies entre le TAG et la queue polyA des séquences obtenues par 3'RACE ont été utilisées pour obtenir les cDNA complets par 5' RACE.

Amorces utilisées pour les deux étapes de la 3' RACE :

Etape 1 : TCTAGATACAAYAATATCCAYCACCCAAGCAA = SEQ ID N° 9

- 25 Etape 2 : TCTAGATGGGRGCAGACTTTCAYTGT= SEQ ID N° 10

Amorces utilisées pour les trois étapes de la 5'RACE :

TABLEAU 1

	Piment	Tomate
Etape 1	GTA TGA GAA ACT AAA CTA = SEQ ID N° 11	AAA TGA GAA ACT AAA CTA = SEQ ID N° 14
Etape 2	CAA CTT TTC AGT ACG AAT TGT GTT T = SEQ ID N° 12	CTT TCC AGT ACG AAT TGT GTT TCT T = SEQ ID N° 15
Etape 3	TCC GAC ATT GCA TCA AGA ATT ATA C = SEQ ID N° 13	CTG CAT CAA GAA CTA TAC GGT GTA A = SEQ ID N° 16

Exemple 2 Test d'hybridation et de sélection des plantes résistantes aux potyvirus (résistance contrôlée par le locus *pvr2/pvr1/pvr5*)

1- Extraction de l'ADN des plantes à analyser

L'extraction de l'ADN des plantes (Solanacées, Cucurbitacées, Crucifères et Composées)

- 5 suit les protocole d'extraction standard basée sur le protocole de micro-extraction d'ADN de Fulton et Tanksley, 1995

2- Digestion de l'ADN et séparation sur gel d'agarose

- 10 Le protocole suivi utilise 2,5U d'enzyme / μg d'ADN. Le volume enzymatique doit être inférieur à 10% du volume réactionnel. Le volume réactionnel est calculé en fonction de la taille du puits : il dépend du type de cuve et de peigne utilisés et du volume du gel (300ml en général). Le volume du tampon spécifique de l'enzyme et de spermidine doivent représenter chacun 10% du volume réactionnel :

- 15
- x μl ADN
 - 1X tampon
 - 1X spermidine (4 mM)
 - 2.5 U d'enzyme / μg d'ADN
 - qsp H₂O volume réactionnel

- 20 La digestion est réalisée à 37°C toute la nuit. En parallèle, sont préparés des échantillons de phages λ digérés par *Hind III* : 0,5 μg / puits. Après digestion, la bonne digestion des ADN est vérifiée sur gel d'agarose 1%, TAE 1X avec 1 μl de produit de digestion. Si la digestion est correcte, le tampon de charge est alors ajouté. Le tampon de charge doit représenter au minimum 10% du volume total (ou 20%). Le dépôt est alors effectué sur un gel de 300ml, NEB 1X, 1% d'agarose contenant 10 μl de BET. La migration se fait à 25V
- 25 pendant 24h dans du tampon NEB 1X (arrêt de la migration à 2 cm du bord du gel).

3- Transfert sur membrane de nylon

Une membrane Hybond N+ et 1 papier Wattman à la taille du gel sont découpés.

- 30 Dans une cuve plate contenant 1L HCl 0,25N, le gel est mis à tremper 30 min. sous agitation (le bleu devient jaune).

Pendant ce temps, le blotteur est préparé en :

- 35
- mouillant une feuille de papier Wattman dans du SSC 2X et en la plaçant sur la plaque poreuse du blotteur.
 - puis en mouillant la membrane et en la plaçant sur le Wattman qui sera recouvert par le cache plastique.

Le gel est rincé dans une cuve contenant de l'H₂O distillée, puis placé sur le cache du blotteur en évitant les bulles et en vérifiant l'étanchéité du système. Le blotteur est mis en route à 50 mb max.

Un peu de soude 0,4N est versée sur le gel. Deux éponges imbibées de soude sont placées sur le gel qui sera recouvert de soude jusqu'à saturation.

Le transfert s'effectue en 2h à 3h. Les membranes sont rincées dans un bain de SSC 2X durant 10 à 15 min puis séchées à l'air libre et cuites 2h à 80°C.

5

4- Préparation des sondes

La préparation des sondes par marquage PCR au ^{32}P concerne des sondes de 3 kb maximum, amplifiées par PCR ou directement sur plasmides, permettant de révéler les bandes majeures pour une sonde, de concentration entre 1 et 5 ng/ μl

10

TABLEAU 2

	Concentration finale	
H ₂ O	25,6 μl	
Tp Promega 10 X	4 μl	1X
MgCl ₂ Promega	2,4 μl	
Mix (ATG 50 μM +dCTP 5 μM)*	2 μl	ATG 2,5 μM ; dCTP 0,25 μM
Taq 2U/ μl	1 μl	
Primer (5pM)	1 μl	
^{32}P -dCTP (1000Ci/mmmole, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)	3 μl	
<hr/>		
ADN sonde	1 μl	
Volume réactionnel final	40 μl	

* : Mix (ATG 50 μM +dCTP5 μM) pour marquage des sondes RFLP par PCR

15 Dilution de dATP, dTTP, dGTP à 10 mM, à partir des solutions mères à 100mM.

5 μl dNTP à 100mM

45 μl H₂O

Dilution de dCTP à 1 mM, à partir de la solution mère à 100 mM.

0,5 μl dCTP à 100 mM

20

49,5 μl H₂O

Mix ATG + dCTP :

2,5 μl dATP à 10 mM

concentration finale : 50 μM

2,5 μl dTTP à 10 mM

concentration finale : 50 μM

2,5 μl dGTP à 10 mM

concentration finale : 50 μM

25

2,5 μl dCTP à 1 mM

concentration finale : 5 μM

490 μl H₂O

Le marquage des sondes se fait au cours de 30 cycles PCR de:

- 30 s à 94°C
- 45 s à 52 °C
- 1 min 30 à 72 °C

5

Une fois marquées, les sondes sont ensuite dénaturées selon le protocole suivant :

- ajouter chaque sonde dans un tube contenant 160 µl de NaOH 0,8 N + 2 à 5 µl de Lambda marqué (par random priming)
- incubé 5 min
- 10 - neutraliser avec 200 µl de Tris HCl 1M

5- Hybridation

Protocole d'après Church et Gilbert, (1984)

15

a- Préhybridation à 65°C toute la nuit

On utilise 20 ml de tampon d'hybridation* par tube pour 2 à 6 demi blots. 25 ml de tampon au delà, sans dépasser 10 demi blots par tube.

Les membranes sont humidifiées dans une boîte contenant du tampon d'hybridation avant d'être légèrement égouttées puis roulées (toutes ensemble) et mises dans le tube.

- 20 Vérifier pendant la préhybridation que les tubes sont étanches et que les membranes se déroulent bien, sinon les changer de sens.

*composition du tampon de pré-hybridation et d'hybridation :

- Pour 500 mL : 21,91 g NaCl; 18,38 g Na Citrate; 380 mL H₂O; 15 mL SDS 20%; 25 mL NaPO₄ 1M pH 7,5; 25 mL Denhardt 100X; 5 mL EDTA 0,25M; 50 mL Dextran sulfate 50%.
- 25

b. Hybridation à 65°C au moins 16 heures

- On laisse décroître la température des tubes avant de les ouvrir pour éviter de mouiller le pas de vis.
- 30

On ajoute la sonde dénaturée (5 min dans NaOH 0,8 M puis arrêt de la dénaturation Tris-HCl 1M).

Dans ces conditions, l'hybridation peut durer 48 ou 72 heures.

35

c. Lavages

Les boîtes (ou bac) sont lavées dans un large excès de tampon (1% SDS (Serva) 40mM NaPi préchauffé à 65°C.

Pour environ 5-10 demi membranes. :

- 1 lavage de 20 min. à 65°C sous agitation. Pour laver, transférer membrane par membrane dans un nouveau bac contenant le tampon préchauffé. Les tampons de lavage radioactifs (au moins les 2 premiers) sont versés dans un bidon prévu à cet effet.
- 1 rinçage de 2-3 min. dans un tampon neuf chauffé à 65°C.

d. Exposition

Les membranes sont essorées sur un lit de papier absorbant constitué d'un champ de papier bleu recouvert de papier blanc type rouleau de Tork ; elles ne doivent pas sécher. Elles sont ensuite mises dans des pochettes plastiques pour l'exposition, placées dans une cassette avec 1 écran intensificateur.

Selon le signal mesuré au compteur Geiger, elles sont exposées à -80°C de une nuit à quelques jours.

e. Déshybridation des membranes avant réhybridation

Les membranes sont déshybridées dans une solution 0,1% SDS 1 mM EDTA chauffée à 80°C (1 litre pour 40 demi-membranes) pendant 20 min à température ambiante. Les membranes sont ensuite rincées 10 min. dans une solution 2X SSC. Enfin, les membranes sont essorées puis stockées humides dans des pochettes en plastique à 4°C.

Exemple 3 : Vérification que les plantes sélectionnées par le biais de la sonde sont résistantes aux potyvirus (test d'infection chez le piment et la tomate)

Le matériel viral employé dans ces tests d'infection sont les isolats N-605 du PVY obtenus à partir de *Solanum tuberosum* (Jakab et al., 1997), ou PVY-LYE84, ou PVY-LYE240r pour la tomate (Legnani et al., 1995) et les isolats PVY-To72, PVY-Si15 pour le piment (Dogimont et al., 1996) ainsi que l'isolat CAA-10 du TEV (Légnani et al., 1996).

Le même protocole est utilisé pour tous les autres isolats de PVY et de TEV qui sont contrôlés par les locus *pvr2/pvr1/pvr5* et/ou *pot-1*. Les isolats sont maintenus selon la procédure Bos (Bos, 1969) et multipliés sur des plants de *Nicotiana tabacum* cv. *Xanthii* avant inoculation des plantes de tomate ou de piment au stade cotylédons à deux feuilles étalées. L'inoculum viral est préparé comme décrit dans les articles de Légnani et al. (1995, 1996) et de Dogimont et al. (1996). Les cotylédons et les deux premières feuilles des plantes sont inoculés mécaniquement. Les lignées sont évaluées sous conditions contrôlées en chambre de culture (14 heures de jour, 18°C nuit et 24°C jour) pour suivre leur réaction après inoculation. 4 semaines après inoculation, toutes les plantes sont

évaluées individuellement pour la présence ou l'absence de l'antigène de capsid du PVY ou du TEV par test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) comme décrit par Légiani *et al.*, (1995, 1996) et Dogimont *et al.* (1996). D'autres protocoles parfaitement connus de l'homme du métier peuvent également être utilisés pour l'inoculation mécanique de potyvirus aux plantes.

Le gel présenté en Figure 1 annexée montre la différence de profils observée entre le marqueur *eIF4E* et la résistance aux potyvirus contrôlée par le locus *pvr2*. Cette co-ségrégation complète entre la résistance aux potyvirus et une copie du gène *eIF4E* a été observée sur une descendance en ségrégation de plus de 500 plantes.

L'ADN génomique de piment est digéré par l'enzyme *EcoRI* et hybridé avec le cDNA *eIF4E* de tabac - SEQ ID N° 1 - (les mêmes profils RFLP sont obtenus par hybridation avec le cDNA tomate -SEQ ID N° 2- et le cDNA piment -SEQ ID N° 3-).

Les plantes sensibles (S) possèdent le fragment de restriction à 7 kb "bas" alors que les plantes résistantes (R) possèdent les fragment de restriction à 7kb "haut". Les plantes hétérozygotes (Ht) présentent les deux fragment de restriction et sont sensibles (car gène récessif).

20

Exemple 4 : Mise en évidence de sites de restriction différentiels entre les copies de *eIF4E* d'un génotype de piment sensible aux potyvirus et d'un génotype résistant.

Par les techniques de séquençage classique, des mutations ponctuelles entre le gène *eIF4E* de la variété de piment "Yolo Wonder" (sensible au potyvirus et porteuse de l'allèle *pvr2*⁺) et celui de la variété de piment "Yolo Y" (résistant aux potyvirus et porteur de l'allèle *pvr2*¹) ont été mise en évidence. Ainsi, en position 200, la séquence SEQ ID N° 3 codante du *eIF4E* dans Yolo Wonder présente un T tandis que la séquence SEQ ID N° 4 codante du *eIF4E* dans Yolo Y présente un A. De la même façon en position 236, la séquence codante de Yolo Wonder présente un T tandis que la séquence codante de Yolo Y présente un G.

La première mutation ponctuelle correspond à un site de restriction *TspRI* (ou ses isoschizomères) existant uniquement chez Yolo Wonder. Ce site de restriction différentiel a été validé par PCR sur le cDNA de Yolo Wonder et Yolo Y: définition d'amorces en 5' et en 3' du cDNA et digestion de l'amplifiat PCR par l'enzyme *TspRI*.

(Même protocole que ci-dessous pour l'enzyme *MvnI* sauf que la digestion se fait à 70°C pour cette enzyme).

La seconde mutation ponctuelle correspond à un site de restriction *MvnI* (ou ses isoschizomères) existant uniquement chez Yolo Y. Ce site de restriction différentiel a été validé par PCR sur le cDNA de Yolo Wonder et Yolo Y: définition d'amorces en 5' et en 3' du cDNA et digestion de l'amplifiat PCR par l'enzyme *MvnI*.

5 Réaction de PCR sur le cDNA :

Amorce sens : AAA AGC ACA CAG CAC CAA CA = SEQ ID N° 17

Amorce antisens : TAT TCC GAC ATT GCA TCA AGA A = SEQ ID N° 18

10 TABLEAU 3

	Concentration finale
H ₂ O	13.05 µl
Tp Promega 10 X	2.5 µl 1X
MgCl ₂ Promega	2.0 µl
dNTP (4 µM @)	1.25 µl
Taq 2U/µl	1 µl
Primer (10 pM)	1.5 de chaque µl
cDNA (10 ng/µl)	3 µl
Volume réactionnel final	25 µl

Cycles d'amplification : 93°C - 3 min / 35 X (93°C-45 s / 53°C-1 min / 72°C-2 min) / 72°C - 10 min

Digestion par l'enzyme *MvnI* : 8 µl de produit PCR + 2 u d'enzyme + 1,3 µl de tampon de l'enzyme + 13,5 µl H₂O 2h à 37°C. Migration sur gel d'agarose 1,2% TAE 1X.

Le gel southern blot présenté en Figure 2 annexée montre les amplifications PCR du gène

15 *elF4E* impliqué dans la résistance aux potyvirus chez le piment et met en évidence un site de restriction *MvnI* différentiel entre sensible et résistant.

Bande 1 :

- amplifiat PCR du gène *elF4E* du piment Yolo Wonder sensible (S) au potyvirus - allèle pvr2+ -
- et absence de digestion enzymatique par *MvnI*.

Bande 2 :

- amplifiat PCR du gène *elF4E* du piment Yolo Y résistant (R) au potyvirus - allèle pvr2¹
- et mise en évidence du site de restriction *MvnI*.

Bande 3 :

- Marqueur de taille 1 kb ladder

Exemple 5 : Mise en évidence de la synténie entre piment et tomate pour les gènes récessifs de résistance aux potyvirus (gène *pot-1* chez la tomate et locus *pvr2* chez le piment)

Cinq gènes majeurs et plusieurs QTL impliqués dans la résistance aux potyvirus sont cartographiés sur le génome du piment. Grâce à l'utilisation de sondes RFLP communes pour cartographier le génome et grâce à la forte conservation de l'ordre des marqueurs entre le génome de la tomate et celui du piment, les facteurs de résistance aux potyvirus du piment sont placés sur la carte de la tomate. La localisation des loci de résistance aux potyvirus du piment sur les chromosomes de tomate ainsi que celle des marqueurs RFLP liés est récapitulée dans le tableau 1 avec les références d'origine. Dans l'objectif d'établir précisément la correspondance entre les régions génomiques du piment et de la tomate avec les gènes de résistance aux potyvirus, les marqueurs RFLP TG135 et Cab3 sont ajoutés à la carte pré-existante de liaison génétique du piment (Lefebvre et al, soumis).

TABLEAU 4. Gènes de résistance aux Potyvirus cartographiés chez le piment (*Capsicum*) et localisation chromosomique de ces gènes sur le génome de la tomate.

Gene	Spectre	Marqueurs liés ^b	Position chromosomique chez la tomate	Référence
<i>pvr1</i>	TEV, PepMoV ^a	TG56, TG135	3	Murphy <i>et al.</i> 1998
<i>pvr2</i>	PVY, TEV ^a	CT31, TG132	3	Caranta <i>et al.</i> 1997 Caranta <i>et al.</i> , unpublished
<i>pvr3</i>	PepMoV ^a	nd ^c	nd ^c	Murphy <i>et al.</i> 1998
<i>Pvr4</i>	PVY, PepMoV	CD72, CT124	10	Caranta <i>et al.</i> 1999 Grube <i>et al.</i> 2000
<i>pvr5</i>	PVY ^a	CT31	3	Caranta <i>et al.</i> , unpublished
<i>pvr6</i>	PVMV	TG57	9	Caranta <i>et al.</i> 1996
<i>Pvr7</i>	PepMoV, PVY ^a	CD72, CT124	10	Grube <i>et al.</i> 2000

^a seul le spectre général de résistance est indiqué pour chaque gène, certains de ces gènes de résistance peuvent être détournés par des souches virulentes.

^b les marqueurs RFLP sont obtenus en utilisant au hasard d'ADN génomique de tomate (TG) ou des sondes ADNc d'épiderme de feuille de tomate (CD and CT) .

^c nd = non déterminé

5 Marquage AFLP et RFLP du gène *pot-1* (article Parrella *et al.*, soumis à *Molecular Plant-Microbe Interactions*)

- L'ADN total est extrait à partir d'environ 1 g de feuilles fraîches de plantes F2 (Caranta *et al.*, 1997).

10 - Les échantillons d'ADN de 6 plantes F2 (issues de l'autofécondation de l'hybride F1 entre *Lycopersicon esculentum* Mospomorist et *L. hirsutum* PI247087) (*pot-1*⁺/*pot-1*⁺) ayant généré des familles F3 complètement sensibles au PVY souche N 605 et les échantillons d'ADN de 9 plantes F2 ayant généré des familles F3 complètement résistantes au potyvirus sont groupés pour une analyse ségrégeante en masse (bulkéd segregant analysis) et pour un étiquetage AFLP de *pot-1*.

15 - Les marqueurs AFLP sont générés selon le protocole de Vos *et al.* (1995) avec les enzymes de restrictions *EcoRI*, *HindIII*, et *MseI*. La première amplification est réalisée en utilisant une combinaison d'amorces avec un seul nucléotide sélectif et une seconde combinaison avec 3 nucléotides sélectifs.

20 - Les marqueurs AFLP liés à *pot-1* sont cartographiés sur les lignées d'introgression de *L. hirsutum* dans *L. esculentum* (Montforte and Tanksley, 2001) afin d'assigner *pot-1* à un chromosome de la tomate.

25 - L'assignation est validée par la cartographie de marqueurs RFLP localisés sur le chromosome cible. La procédure RFLP est décrite par Saliba-Colombani *et al.* (2000). Le criblage du polymorphisme entre *Lycopersicum esculentum* Mospomorist (sensible aux potyvirus) et *L. hirsutum* PI247087 (résistant aux potyvirus) est réalisé avec 3 enzymes de restrictions (*EcoRI*, *HindIII* et *XbaI*) et des marqueurs RFLP préalablement cartographiés chez la tomate (CT, ADNc de tomate dérivé de l'ARNm de tissu épidermique de tomate, TG, clones d'ADN génomique de tomate ; la sonde CAB3 codant pour un polypeptide lié à la chlorophylle a et b, Tanksley et al., 1992) Ce criblage permet de cartographier des
30 marqueurs supplémentaires sur le chromosome 3.

- L'analyse de ségrégation pour les marqueurs moléculaires (AFLP, RFLP) et pour les données de résistance sont analysés par le logiciel Mapmaker/Exp v. 3.0 avec un Lod minimum de 4.0 et un pourcentage de recombinaison maximum de 0,3. Le pourcentage de recombinaison est alors converti en distance de cartographie en centiMorgans (cM) en
35 utilisant la fonction de cartographie Kosambi (Kosambi, 1944).

Ces résultats ont permis de localiser le gène *pot-1* de résistance au PVY chez la tomate sur le chromosome 3 et de montrer que ce gène était encadré par les mêmes marqueurs RFLP que le locus *pvr2* chez le piment.

5 Cartographie de *eIF4E* chez la tomate.

En parallèle, le cDNA *eIF4E* de tabac a été cartographié par la méthode RFLP décrite précédemment sur les lignées d'introgression de *L. pennellii* dans *L. esculentum* (Eshed and Zamir, 1995). Ce travail a permis de localiser 5 copies du gène *eIF4E* chez la tomate. Une de ces copies a été localisée sur le chromosome 3, dans la même région génomique que le gène *pot-1* confirmant ainsi la synténie entre piment et tomate pour la résistance aux potyvirus et par conséquent la possibilité d'utiliser *eIF4E* comme marqueurs et outils de sélection de la résistance.

Le même profil est observé lors d'une hybridation avec le cDNA de tomate (SEQ ID N° 2) ou de piment (SEQ ID N° 3). L'ADN génomique est digéré avec EcoRV.

- 15 Cette mise en évidence de synténie entre le piment et la tomate pour les gènes récessifs de résistance aux potyvirus" permet de dire que si *eIF4E* est le gène de résistance chez le piment, alors *eIF4E* est également le gène de résistance chez la tomate.

20 Exemple 6 : Criblage de la banque BAC du génome du piment avec des amorces définies sur la séquence codante *eIF4E* du génotype Yolo Wonder, démonstration de la co-ségrégation avec la résistance et détermination de la structure génomique du gène *eIF4E* qui co-ségrège avec *pvr2*.

- 25 Une banque BAC de piment a été construite à partir d'une lignée haploïde doublée HD208 issue de l'hybride F1 d'un croisement entre *Capsicum annuum* Yolo Wonder et *C. annuum* Perennial. HD208 contient l'allèle dominant de sensibilité *pvr2+*.

L'ADN de haut poids moléculaire a été extrait selon la méthode décrite dans <http://www.ncgr.org/research/jag/papers00/paper300/indexpage300.html>. L'ADN a

- 30 ensuite été digéré partiellement et séparément par trois enzymes de restriction (*EcoRI*, *BamHI* et *HindIII*) afin d'augmenter la représentativité de l'ensemble du génome. L'ADN digéré a été cloné dans le vecteur pCUGIBAC1. (<http://www.ncgr.org/research/jag/papers00/paper300/indexpage300.html>)

La banque BAC de piment est constituée de 239.232 clones avec une taille moyenne d'insert de 125kb ce qui correspond à une représentativité théorique de 10 équivalents

- 35 génome (taille du génome du piment 3000 Mpb). Cette banque BAC a été organisée en 623 pools d'ADN en vue d'un criblage par PCR (1 pool correspond au mélange d'ADN de 384 clones).

Les amorces suivantes ont été définies sur la séquence codante de *eIF4E* de Yolo Wonder.

Pim1 : 5' AGA CTT TCA TTG TTT CAA GCA TAA 3' = SEQ ID N° 19

Pim4 : 5' GAT TAG AAA GTG CAA ACA CCA ATA C 3' = SEQ ID N° 20

- 5 Ce couple d'amorces amplifie sur le cDNA une bande de 493 pb et sur l'ADN génomique de HD208 une bande de 1800 pb.

Ce couple d'amorces a été utilisé pour cribler la banque BAC de piment. Quatre clones BAC ont été identifiés portant la bande de 1800 pb (Clones 27-BI, 5-2H, 111-4H et 184-4H).

- 10 Ces quatre clones BAC ont été digérés par *EcoRI* et les profils de restriction montrent qu'ils sont chevauchants et correspondent donc bien à un même locus. Tous les clones BAC révèlent une bande *EcoRI* de 7 kb qui a été clonée dans un vecteur pGEM3Zf. Cette bande de 7kb, obtenue par digestion *EcoRI* correspond à celle qui co-ségrège avec la sensibilité aux potyvirus (voir exemple 3)

15

(1 = clone 27-BI ; 2 = clone 5-2H ; 3 = clone 111-4H ; 4 = clone 184-4H)

- 20 La présence de l'amplifiat de 1800 pb dans ce fragment de 7 kb confirme que ces quatre clones BAC portent le gène *eIF4E* correspondant au cDNA cloné. Le séquençage de cet insert de 7 kb a permis de définir la taille du gène qui est de 5500 pb et de définir la structure exon/intron : 5 exons et 4 introns (voir séquence ID N° 3).

- Exemple 7 : Expérience d'expression transitoire du cDNA *eIF4E* de Yolo Wonder dans un génotype de piment résistant (porteur de l'allèle *pvr2*¹) pour validation du rôle de *eIF4E* dans la sensibilité aux Potyvirus.**

- 30 Afin de valider l'hypothèse que l'allèle de sensibilité *pvr2*⁺ correspond au gène *eIF4E* de Yolo Wonder, des expériences d'expression transitoire du cDNA *eIF4E* de Yolo Wonder via un vecteur viral PVX (Potato Virus X) (Chapman et al., 1992) sont réalisées sur un génotype résistant Yolo Y, porteur de l'allèle *pvr2*¹.

Le cDNA *eIF4E* issu du génotype sensible Yolo Wonder est cloné de manière orientée dans un vecteur d'expression PVX-CES-35S au site de clonage *Clal* et *Sall*.

- 35 Les deux génotypes de *C. annuum* Yolo Wonder et Yolo Y sont sensibles au PVX : détection du virus par ELISA sur feuilles inoculées et feuilles systémiques 10 jours après inoculation.

Le génotype résistant (porteur de l'allèle *pvr2*¹) Yolo Y est co-inoculé avec ce plasmide recombinant et avec le pathotype 0 du Potato Virus Y (PVY). L'expression transitoire du

gène *eIF4E* issu du génotype sensible Yolo Wonder via le vecteur PVX recombinant permet au PVY de se multiplier dans le génotype résistant. Le PVY est détecté par la méthode ELISA ou RT-PCR (Legnani et al., 1995, 1996, Dogimont et al., 1996).

5

Exemple 8 : Recherche de mutants dans le gène *eIF4E* et dans les gènes du complexe d'initiation de la traduction des ARN pour la création de plantes résistantes aux potyvirus.

- 10 Les membres de la famille multi-génique *eIF4E* appartiennent à un complexe d'au moins 8 protéines formant le complexe d'initiation de la traduction dans les cellules eucaryotes (Browning 1996).

L'identification et la caractérisation de mutants dans *eIF4E* et dans les autres gènes du complexe d'initiation de la traduction pour la création de plantes résistantes aux potyvirus

- 15 se déroule en 4 étapes et utilise un système de TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes McCallum et al., 2000) :

(1) Génération d'une collection de mutants de tomate par mutagenèse chimique. Le génotype choisi est une microtomate, *Lycopersicum esculentum Microtom* qui présente des caractéristiques biologiques intéressantes (Meissner et al., 2000) : sensible aux
20 potyvirus (PVY, TEV et PVMV), croissance à haute densité (1000 plantes/m²) et temps de génération de 3-4 mois. Les mutations sont obtenues par mutagenèse chimique à l'éthyl-méthane sulfonate (EMS) (Koornneef et al., 1982) : mutagenèse sur 30.000 graines, semis des mutants et fabrication de la génération M2 à partir de 5000 plantes M1.

- (2) Extraction d'ADN de 20 plantes par famille M2 et constitution de pools d'ADN en 3
25 dimensions à partir d'une population de 100 000 plantes M2 (5000 familles).

(3) Amplification par PCR des gènes cibles et recherche des mutations par HPLC dénaturante. Les séquences des gènes impliqués dans le complexe d'initiation de la traduction sont disponibles sur le site <http://www.tigr.org/tdb/lgi>. Les produits PCR sont ensuite dénaturés puis appariés pour permettre la formation d'hétéroduplexes. Les
30 mutations sont ensuite détectées soit par HPLC dénaturante (McCallum et al., 2000) soit par une enzymes qui permet la détection des "mismatch" dans les hétéroduplex (enzyme CEL1, Oleykowski et al., 1998).

- (4) Caractérisation des mutants pour évaluation de leur comportement vis-à-vis des potyvirus : passage d'un phénotype sensible à un phénotype résistant. La procédure
35 d'inoculation et de détection des potyvirus (Potato virus Y, Tobacco etch virus, Pepper veinal mottle virus) est identique à celle décrite dans l'exemple 3.

Exemple 9 : Création de plantes résistantes aux potyvirus par des méthodes pouvant impliquer la transgénèse.

- Alternativement à l'exemple 8, l'allèle de résistance du gène *eIF4E* (identifié ici chez le piment) ou tout autre allèle de *eIF4E* qui confère la résistance aux potyvirus (identifié à la base des exemples 1 à 8) peut être transféré *in planta* par des méthodes de type mutagénèse dirigée (Hohn et al., 1999), recombinaison homologue (Kempin et al., 1997) ou par des méthodes de surexpression. Dans les expériences de surexpression, l'allèle d'*eIF4E* qui confère la résistance est exprimé sous un promoteur fort de type 35S du virus CaMV par transgénèse *in planta* (Jones et al., 1992; Bevan 1984).
- Des plantes résistance peuvent également être créées par knock-out du gène *eIF4E* endogène par des méthodes de type "gene silencing" (Post Transcriptionnal Gene Silencing) et l'expression simultanées par transgénèse de la forme de *eIF4E* conférant la résistance aux potyvirus. Un knock-out spécifique par PTGS peut-être réalisé en le digérant contre le 5' UTR du gène *eIF4E* endogène; la forme d'*eIF4E* qui confère la résistance exprimée par transgénèse ne portera pas la séquence 5' UTR du *eIF4E* endogène. Cette spécificité du knock-out par PTGS contre les 5' UTR est basé sur les nouvelles données issues de la compréhension du mécanisme de PTGS (Nishikura 2001).
- L'ensemble des protocoles décrits ci-dessus sont parfaitement connus de l'homme du métier.

Bibliographie

- Altschul et al., 1990, J.Mol.Biol., 215 :403-10
- Altschul et al., 1993, J.Mol.Evol., 36:290-300
- 5 - Bevan et al., 1984, NAR 12, 8711-8721
- Bos, 1969, Meded. Fac. Landbouwwet Gent. 34, 875-887
- Browning, 1996. Plant Mol. Biol. 32:107-144
- Caranta et al., 1997 Molecular Plant-Microbe Interactions 10(7), 872-878
- Chapman et al., 1992. Plant J. 2(4):549-557
- 10 - Church et Gilbert 1984, PNAS 81, 1991-1995
- Dogimont et al., 1996. Euphytica 88:231-239
- Dougherty et Carrington, 1988. Annual review of Phytopathology 26, 123-143
- Flor, 1955. Phytopathol. 45:680-685
- Filatti et al., 1987. Bio/Technology 5:726-730
- 15 - Fraser, 1992. Euphytica 63:175-185
- Fulton et Tanksley, 1995.
- Hammond-Kosack et Jones, 1997. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48:575-607
- Hohn et al., 1999, PNAS 96, 8321-8323
- 20 - Jakab et al., 1997, Journal of General Virology 78, 3141-3145
- Jones et al., 1992, Transgenic research1, 285-297
- Keller et al., 1998. Mol. Plant-Microbe Interact. 11:124-130
- Kempin et al., 1997, Nature 389, 802-803
- Kohler et Milstein, 1975 Nature 256, 495
- 25 - Koornneef et al., 1982. Mutat. Res. 93:109-123
- Kozbor et al. 1983, Hybridoma 2 (1), 7-16
- Langenberg et Zhang, 1997. Journal of Structural Biology 118, 243-247
- Légiani et al, 1995 Euphytica 86, 219-226.
- Légiani et al, 1996, Plant disease, 80 (3), 306-309
- 30 - McCallum et al., 2000. Plant Physiol. 123:439-442
- McCormick et al., 1986. Plant Cell Reports 5:81-84
- Martin et Gelie, 1997. European Journal of Plant Pathology 103, 427-431
- Martineau et al., 1998, Journal of Molecular Biology 280 (1), 117-127
- Meissner et al., 2000. Plant J. 22:265-274
- 35 - Morel, 2001. Thèse de Doctorat de l'Université de Rennes 1, 136.
- Murphy et al., 1990, Virology 178, 285-288
- Nicolas et al., 1997. Virology 237:452-459
- Nishikura, 2001, Cell 107, 415-418

- Oleykowski et al., 1998. Nucleic Acids Res. 26:4597-4602
- Redondo, 2001. Thèse de Doctorat de l'Université Bordeaux 2, 160pp.
- Riechmann et al., 1992. Journal of General Virology 73, 1-16
- Rodriguez et al., 1998. Plant J. 13(4):465-473.
- 5 - Rudd K et al., 1998. J. Biol. Chem. 273 (17) : 10325-10330
- Sambrook et al., 1989 Molecular Cloning : A Laboratory Manual,
- Sanchez-Pescador et al., 1988. J. Clin. Microbiol. 26 (10) : 1934-1938
- Schaad et al., 2000. Virology 273:300-306
- Takahashi et al., 1997Virus genes 14(3), 235-243.
- 10 - Urdea et al., 1988.Nucleic Acids Research. 11 : 4937-4957
- Wittman et al. 1997. Virology 234:84-92

REVENDEICATIONS

- 1) Utilisation d'un polynucléotide choisi parmi :
 - a) un polynucléotide codant pour une protéine *eIF4E* végétale ;
 - 5 b) un polynucléotide complémentaire du polynucléotide a) ;
 - c) un fragment d'au moins 10 pb d'un polynucléotide a) ou b) ;
 pour la sélection de plantes résistantes aux potyvirus.
- 2) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que les plantes sélectionnées font partie du groupe des solanacées, du groupe des crucifères, du groupe des
 10 composées et/ou du groupe des cucurbitacées.
- 3) Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que les plantes sélectionnées sont des solanacées.
- 4) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite protéine *eIF4E* est choisie parmi :
 15
 - le polypeptide de séquence SEQ ID N° 5 ;
 - le polypeptide de séquence SEQ ID N° 6 ;
 - le polypeptide de séquence SEQ ID N° 7 ;
 - le polypeptide de séquence SEQ ID N° 8.
- 5) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit
 20 polynucléotide est choisi parmi :
 - le polynucléotide de séquence SEQ ID N° 1 ;
 - le polynucléotide de séquence SEQ ID N° 2 ;
 - le polynucléotide de séquence SEQ ID N° 3 ;
 - le polynucléotide de séquence SEQ ID N° 4 ;
 25 ainsi que leurs complémentaires, ou les fragments d'au moins 10 pb desdits polynucléotides ou complémentaires.
- 6) Procédé de sélection de plantes résistantes aux potyvirus, caractérisé en ce que :
 - on digère l'ADN extrait d'une plante à tester par une enzyme de restriction appropriée ;
 - 30 - on dénature l'ADN digéré,
 - on met ledit ADN dénaturé en présence d'une sonde constituée par un polynucléotide tel que défini dans une quelconque des revendications 1 ou 5, préalablement pourvu d'au moins un marqueur, de façon à réaliser l'hybridation entre ledit polynucléotide et ledit ADN ;
 - 35 - on élimine l'ADN et la sonde non hybridés ;
 - on révèle l'hybridation à l'aide du marqueur,
 - on sélectionne les plantes qui possèdent un profil d'hybridation correspondant à la co-ségrégation de la cible hybridée avec la sonde marquée et de l'allèle de résistance ou de sensibilité, la distinction entre les plantes sensibles et les plantes résistantes se faisant par
 40 la différence de taille des fragments hybridés.
- 7) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'enzyme de restriction utilisée est *EcoRI*.
- 8) Procédé de sélection de plantes résistantes aux potyvirus, caractérisé en ce que :
 45
 - on amplifie par PCR la séquence codante du gène *eIF4E*, à partir de l'ADN de la plante à tester ;
 - on digère le produit d'amplification avec une enzyme de restriction appropriée ;
 - on sépare les éventuels fragments obtenus ;

et on sélectionne les plantes résistantes ou sensibles selon le profil de restriction dudit produit d'amplification.

5 9) Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que les plantes sensibles aux potyvirus sont détectées par un profil de restriction faisant apparaître la présence d'un site de coupure par l'enzyme *TspRI* ou l'un de ses isoschizomères et les plantes résistantes aux potyvirus sont détectées par un profil de restriction faisant apparaître l'absence dudit site de coupure par *TspRI* ou l'un de ses isoschizomères et la présence d'un site de coupure par l'enzyme *MvnI* ou l'un de ses isoschizomères.

10 10) Procédé selon une quelconque des revendications 8 ou 9, caractérisé en ce que l'amplification par PCR de la séquence codante du gène *eIF4E*, est effectuée en utilisant comme amorces les oligonucléotides SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 18.

11) Polynucléotide codant pour une protéine *eIF4E* de plante, caractérisé en ce qu'il est choisi dans le groupe défini par les séquences suivantes :

- SEQ ID N° 1
- 15 - SEQ ID N° 3
- SEQ ID N° 4

12) Polynucléotide utilisable comme amorce pour l'amplification par PCR d'une séquence codant pour une protéine *eIF4E* de plante, caractérisé en ce qu'il est choisi dans le groupe défini par les séquences suivantes :

20 SEQ ID N° 17

SEQ ID N° 18.

13) Kit pour la mise en œuvre d'un procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une paire d'amorces permettant l'amplification de la séquence codante d'un gène *eIF4E* de plante ;
- 25 - une enzyme de restriction reconnaissant un site inclus dans ladite séquence codante.

14) Kit selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une paire d'amorces définies par les séquences SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 18 ;
- au moins une enzyme de restriction choisie parmi *TspRI* ou l'un de ses isoschizomères et
- 30 *MvnI* ou l'un de ses isoschizomères.

15) Utilisation d'un site de restriction par *MvnI* correspondant de préférence à la séquence sens : CG[^]CG et à la séquence antisens : GC[^]GC, et/ou d'un site de restriction par *TspRI* correspondant de préférence à la séquence sens : NNCASTGNN[^] et à la séquence antisens : [^]NNGTSACNN, comme marqueur(s) oligonucléotidique(s) de

35 résistance ou de sensibilité aux potyvirus.

16) Utilisation d'un polypeptide choisi parmi :

- le polypeptide de séquence SEQ ID N° 5 ;
- le polypeptide de séquence SEQ ID N° 6 ;
- le polypeptide de séquence SEQ ID N° 7 ;
- 40 - le polypeptide de séquence SEQ ID N° 8 ;

ou d'un anticorps spécifique d'un desdits polypeptides, pour la sélection de plantes résistantes aux potyvirus.

17) Polypeptide choisi parmi :

- le polypeptide de séquence SEQ ID N° 5 ;
- 45 - le polypeptide de séquence SEQ ID N° 7 ;
- le polypeptide de séquence SEQ ID N° 8 ;

18) Anticorps spécifiquement dirigés contre un polypeptide selon la revendication 17, ou un fragment d'au moins 6 acides aminés dudit polypeptide.

19) Procédé non biologique d'obtention de plantes résistantes à au moins un potyvirus caractérisé en ce qu'il comprend l'introduction de l'allèle du gène *eIF4E* associé à la résistance audit potyvirus dans le génome desdites plantes.

20) Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que l'apparition de l'allèle de résistance est provoquée par la mise en oeuvre d'une méthode sélectionnée dans le groupe comprenant :

- mutagenèse, avantageusement "Tilling",
- recombinaison homologue,
- surexpression,
- 10 - insertion/délétion,
- "gene silencing" / transgénèse,
- et leurs combinaisons.

21) Unité génétique construite, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polynucléotide tel que défini dans une quelconque des revendications 1 ou 5.

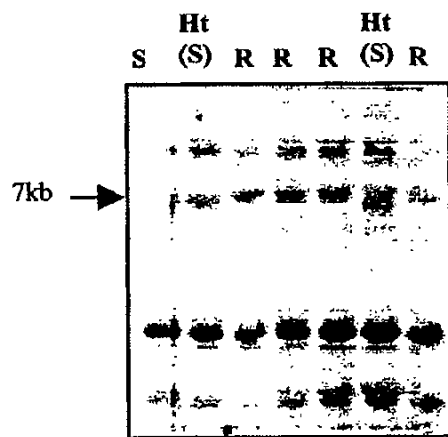
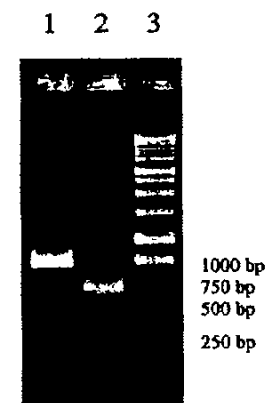
15 22) Vecteur de transformation de cellules végétales, caractérisé en ce qu'il comporte au moins une unité génétique selon la revendication 21.

23) Cellules végétales transformées au moyen d'au moins un vecteur selon la revendication 22 ou d'au moins une unité génétique selon la revendication 21.

24) Microorganismes transformés au moyen d'au moins un vecteur selon la revendication 22 ou d'au moins une unité génétique selon la revendication 21.

20 25) Plantes transformées au moyen d'au moins un vecteur selon la revendication 22 ou d'au moins une unité génétique selon la revendication 21.

1/1

**FIG.1****FIG.2**

LISTAGE DES SEQUENCES

<110> GENOPLANTE
 <120> Procédé de sélection ou d'obtention de plantes résistantes aux
 potyvirus et séquences "marquant" ou "conférant" cette résistance.
 <130> Fwd Ci 019
 <140> FR 02 01583
 <141> 2002-02-08
 <160> 20
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 961
 <212> DNA
 <213> Tabaco sp

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(961)
 <223> Séquence cDNA du gène eIF4E

<400> 1
 gaattcggca cgaggaaaca ttgaactttt cctacgaata caaattcggga atttctgtga 60
 gaagttacac attttcagtt gaaacccatc accaaaagtc caaaatcaca aatttccaga 120
 cgaaagctat gtgttgagaa caccaaaatg gttgatgaag tagagaaacc ggtgtcgtta 180
 gaggaatcga agactaatac tcgtgagggtg gaagaggaag gagagatcgt gggggaatca 240
 gacgatacga tgcgtctttt agggaaccca agcatggcaa tgaacacgc gctagaacat 300
 tcatggacat ttggttcga taacccatca gggaaatcaa aacaggctgc ttggggtagt 360
 tccattcgac caatttacac ettctccact gtccaagatt tttggagtgt gtacaacaat 420
 atccaccacc caagcaaatt ggctgtgggg gcagactttc actgttttaa gaataaaatt 480

```

gagccaaagt gggaggatcc tgtctgcgcc aacggaggaa agtggacaat gagcttttcg      540
aggggtaaatt ctgatacctg ctggctgtat acgctgctgg ctatgattgg agaacaattt      600
gactgcggag atgaaatttg tggagctggtt attaattgttc gagttagaca agaaaaata      660
gctttgtgga ccaggaatgc tgccaatgaa acagctcagg tgagcattgg taaacagtgg      720
aaggaatttc tggattacaa tgactcgggtt ggctttatat ttcattgatga tgcaaagaag      780
ctagacagag ctgccaagaa tcgttattct gtgtagttct atcgttacaa taggaattgt      840
gaacgacaca gttactgaga agcagtcacc tgtggctgcc tgttttgacc gcttacattg      900
gtattcacag ttttcataag gaaatttggtt tggttttgaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      960
a                                                                                   961

```

<210> 2

<211> 696

<212> DNA

<213> Tomato sp

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(661)

<223> N° d'accension AF 259801 genbank

<400> 2

```

atggcagcag ctgaaatgga gagaacgatg tcgtttgatg cagctgagaa gttgaaggcc      60
gccgatggag gaggaggaga ggtagacgat gaacttgaag aaggtgaat tgttgaagaa      120
tcaaatgata cggcatcgta tttagggaaa gaaatcacag tgaagcatcc attggagcat      180
tcattggactt tttggtttga taacctacc actaaatctc gacaaactgc ttggggaagc      240

```

```

tcacttcgaa atgtctacac tttctccact gttgaaaatt tttggggtgc ttacaataat   300
atccatcacc caagcaagtt aattatggga gcagactttc attgttttaa gcacaaaatt   360
gagccaaagt ggaagatcc tgtatgtgcc aatggaggga cgtggaaaat gagtttttcg   420
aagggtaat ctgataccag ctggctgtat acgctgctgg caatgattgg acatcaattc   480
gatcatggag atgaaatttg tggagcagtt gttagtgtcc gggctaaggg agaaaaata   540
gctttgtgga ccaagaatgc tgcaaatgaa acagctcagg ttagcattgg taagcaatgg   600
aagcagtttc tagattacag tgattcggtt ggcttcatat ttcacgacga tgcaaagagg   660
ctcgacagaa atgccaagaa tcgttacacc gtatag                               696

```

<210> 3

<211> 687

<212> DNA

<213> Pimiento sp

<220>

<221> Exon

<222> (1)..(278)

<223> Séquence codante gène eIF4E

Génotype Yolo Wonder porteur de l'allèle dominant de sensibilité
pvr2+

<220>

<221> Exon

<222> (279)..(444)

<223> Séquence codante gène eIF4E

Génotype Yolo Wonder porteur de l'allèle dominant de sensibilité
pvr2+

<220>

<221> Exon

<222> (445)..(570)

<223> Séquence codante gène eIF4E

Génotype Yolo Wonder porteur de l'allèle dominant de sensibilité
pvr2+

<220>

<221> Exon

<222> (571)..(636)

<223> Séquence codante gène eIF4E

Génotype Yolo Wonder porteur de l'allèle dominant de sensibilité
pvr2+

<220>

<221> Exon

<222> (637)..(687)

<223> Séquence codante gène eIF4E

Génotype Yolo Wonder porteur de l'allèle dominant de sensibilité
pvr2+

<220>

<221> misc_feature

<222> (195)..(204)

<223> Site de restriction pour Tsp RI

Séquence codante gène eIF4E

Génotype Yolo Wonder porteur de l'allèle dominant de sensibilité
pvr2+

<400> 3

atggcaacag ctgaaatgga gaaaacgacg acgtttgatg aagctgagaa ggtgaaattg	60
aatgctaattg aggcagatga tgaagttgaa gaaggtgaaa ttgttgaaga aactgatgat	120
acgacgtcgt atttgagcaa agaaatagca acaaagcatc cattagagca ttcattggact	180
ttctggtttg ataattccagt ggcgaaatcg aaacaagctg cttggggtag ctgccttcgc	240
aacgtctaca ctttctccac tgttgaagat ttttggggtg cttacaataa tatccaccac	300

ccaagcaagt tagttgtggg agcagactta cattgtttca agcataaaat tgagccaaag 360
 tgggaagatc ctgtatgtgc caatggaggg acatggaaaa tgagtttttc aaagggtaaa 420
 tctgatacca gctggctata tacgctgctt gcaatgattg gacatcaatt cgatcatgaa 480
 gatgaaatct gtggagcagt agttagtgtc agaggtaagg gagaaaaaat atctttgtgg 540
 accaagaatg ctgcaaatga aacggctcag gttagcattg gtaagcaatg gaagcagttt 600
 ctggattaca gcgacagtgt tggcttcata tttcacgacg atgcaaagag gctcgacaga 660
 aatgcaaaga atcgttacac agtataa 687

<210> 4

<211> 687

<212> DNA

<213> Pimiento sp

<220>

<221> Exon

<222> (1)..(278)

<223> Séquence codante gène eIF4E

Génotype Yolo Y porteur de l'allèle de résistance pvr21

<220>

<221> Exon

<222> (279)..(444)

<223> Séquence codante gène eIF4E

Génotype Yolo Y porteur de l'allèle de résistance pvr21

<220>

<221> Exon

<222> (445)..(570)

<223> Séquence codante gène eIF4E

Génotype Yolo Y porteur de l'allèle de résistance pvr21

<220>
 <221> Exon
 <222> (571)..(636)
 <223> Séquence codante gène eIF4E
 Génotype Yolo Y porteur de l'allèle de résistance pvr21

<220>
 <221> Exon
 <222> (637)..(687)
 <223> Séquence codante gène eIF4E
 Génotype Yolo Y porteur de l'allèle de résistance pvr21

<220>
 <221> mutation
 <222> (200)..(200)
 <223> Séquence codante gène eIF4E
 Génotype Yolo Y porteur de l'allèle de résistance pvr21
 Substitution de la thimidine de SEQ ID N°3 par l'adénosine

<220>
 <221> mutation
 <222> (236)..(236)
 <223> Séquence codante gène eIF4E
 Génotype Yolo Y porteur de l'allèle de résistance pvr21
 Substitution de la thimidine de SEQ ID N°3 par la guanosine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (233)..(236)
 <223> Site de restriction de MvnI
 Séquence codante gène eIF4E
 Génotype Yolo Y porteur de l'allèle de résistance pvr21

<400> 4
 atggcaacag ctgaaatgga gaaaacgacg acgtttgatg aagctgagaa ggtgaaattg 60
 aatgctaattg aggcagatga tgaagttgaa gaaggtgaaa ttgttganga aactgatgat 120

```

acgacgtcgt atttgagcaa agaaatagca acaagcatc cattagagca ttcattggact 180
ttctgggtttg ataatccaga ggcgaaatcg aaacaagctg cttggggtag ctgcgcgcgc 240
aacgtctaca ctttctccac tgttgaagat ttttggggtg cttacaataa tatccaccac 300
ccaagcaagt tagttgtggg agcagactta cattgtttca agcataaaat tgagccaaag 360
tggaagatc ctgtatgtgc caatggaggg acatggaaaa tgagtttttc aaagggtaaa 420
tctgatacca gctggctata tacgctgctt gcaatgattg gacatcaatt cgatcatgaa 480
gatgaaattt gtggagcagt agttagtgtc agaggtaagg gagaanaaat atctttgtgg 540
accaagaatg ctgcaaatga aacggctcag gtagcattg gtaagcaatg gaagcagttt 600
ctggattaca ggcacagtgt tggttcata tttcacgacg atgcaaagag gctcgacaga 660
aatgcaaaga atcgttacac agtataa 687

```

<210> 5

<211> 222

<212> PRT

<213> Tabaco sp

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)..(222)

<223> Séquence d'acides aminés issue de la traduction de la séquence
codante eIF4E

<400> 5

```

Met Val Asp Glu Val Glu Lys Pro Val Ser Leu Glu Glu Ser Lys Thr
1           5           10           15

```

```

Asn Thr Arg Glu Val Glu Glu Gly Glu Ile Val Gly Glu Ser Asp
20           25           30

```

Asp Thr Met Ser Ser Leu Gly Asn Pro Ser Met Ala Met Lys His Ala
 35 40 45

Leu Glu His Ser Trp Thr Phe Trp Phe Asp Asn Pro Ser Gly Lys Ser
 50 55 60

Lys Gln Ala Ala Trp Gly Ser Ser Ile Arg Pro Ile Tyr Thr Phe Ser
 65 70 75 80

Thr Val Glu Asp Phe Trp Ser Val Tyr Asn Asn Ile His His Pro Ser
 85 90 95

Lys Leu Ala Val Gly Ala Asp Phe His Cys Phe Lys Asn Lys Ile Glu
 100 105 110

Pro Lys Trp Glu Asp Pro Val Cys Ala Asn Gly Gly Lys Trp Thr Met
 115 120 125

Ser Phe Ser Arg Gly Lys Ser Asp Thr Cys Trp Leu Tyr Thr Leu Leu
 130 135 140

Ala Met Ile Gly Glu Gln Phe Asp Cys Gly Asp Glu Ile Cys Gly Ala
 145 150 155 160

Val Ile Asn Val Arg Val Arg Gln Glu Lys Ile Ala Leu Trp Thr Arg
 165 170 175

Asn Ala Ala Asn Glu Thr Ala Gln Val Ser Ile Gly Lys Gln Trp Lys
 180 185 190

Glu Phe Leu Asp Tyr Asn Asp Ser Val Gly Phe Ile Phe His Asp Asp
 195 200 205

Ala Lys Lys Leu Asp Arg Ala Ala Lys Asn Arg Tyr Ser Val
 210 215 220

<210> 6
 <211> 231
 <212> PRT
 <213> Tomato sp

<220>
 <221> DOMAIN
 <222> (1)..(231)
 <223> Séquence d'acides aminés issue de la traduction de la séquence
 codante eIF4E

<400> 6
 Met Ala Ala Ala Glu Met Glu Arg Thr Met Ser Phe Asp Ala Ala Glu
 1 5 10 15
 Lys Leu Lys Ala Ala Asp Gly Gly Gly Gly Glu Val Asp Asp Glu Leu
 20 25 30
 Glu Glu Gly Glu Ile Val Glu Glu Ser Asn Asp Thr Ala Ser Tyr Leu
 35 40 45
 Gly Lys Glu Ile Thr Val Lys His Pro Leu Glu His Ser Trp Thr Phe
 50 55 60
 Trp Phe Asp Asn Pro Thr Thr Lys Ser Arg Gln Thr Ala Trp Gly Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Arg Asn Val Tyr Thr Phe Ser Thr Val Glu Asn Phe Trp Gly
 85 90 95
 Ala Tyr Asn Asn Ile His His Pro Ser Lys Leu Ile Met Gly Ala Asp
 100 105 110
 Phe His Cys Phe Lys His Lys Ile Glu Pro Lys Trp Glu Asp Pro Val
 115 120 125
 Cys Ala Asn Gly Gly Thr Trp Lys Met Ser Phe Ser Lys Gly Lys Ser
 130 135 140

Asp Thr Ser Trp Leu Tyr Thr Leu Leu Ala Met Ile Gly His Gln Phe
 145 150 155 160

Asp His Gly Asp Glu Ile Cys Gly Ala Val Val Ser Val Arg Ala Lys
 165 170 175

Gly Glu Lys Ile Ala Leu Trp Thr Lys Asn Ala Ala Asn Glu Thr Ala
 180 185 190

Gln Val Ser Ile Gly Lys Gln Trp Lys Gln Phe Leu Asp Tyr Ser Asp
 195 200 205

Ser Val Gly Phe Ile Phe His Asp Asp Ala Lys Arg Leu Asp Arg Asn
 210 215 220

Ala Lys Asn Arg Tyr Thr Val
 225 230

<210> 7

<211> 228

<212> PRT

<213> Pimiento sp

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)..(228)

<223> Séquence d'acides aminés issue de la traduction de la séquence
 codante de eIF4E
 Génotype Yolo Wonder porteur de l'allèle dominant de sensibilité
 pvr2+

<400> 7

Met Ala Thr Ala Glu Met Glu Lys Thr Thr Thr Phe Asp Glu Ala Glu
 1 5 10 15

Lys Val Lys Leu Asn Ala Asn Glu Ala Asp Asp Glu Val Glu Glu Gly
 20 25 30

Glu Ile Val Glu Glu Thr Asp Asp Thr Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Glu
 35 40 45

Ile Ala Thr Lys His Pro Leu Glu His Ser Trp Thr Phe Trp Phe Asp
 50 55 60

Asn Pro Val Ala Lys Ser Lys Gln Ala Ala Trp Gly Ser Ser Leu Arg
 65 70 75 80

Asn Val Tyr Thr Phe Ser Thr Val Glu Asp Phe Trp Gly Ala Tyr Asn
 85 90 95

Asn Ile His His Pro Ser Lys Leu Val Val Gly Ala Asp Leu His Cys
 100 105 110

Phe Lys His Lys Ile Glu Pro Lys Trp Glu Asp Pro Val Cys Ala Asn
 115 120 125

Gly Gly Thr Trp Lys Met Ser Phe Ser Lys Gly Lys Ser Asp Thr Ser
 130 135 140

Trp Leu Tyr Thr Leu Leu Ala Met Ile Gly His Gln Phe Asp His Glu
 145 150 155 160

Asp Glu Ile Cys Gly Ala Val Val Ser Val Arg Gly Lys Gly Glu Lys
 165 170 175

Ile Ser Leu Trp Thr Lys Asn Ala Ala Asn Glu Thr Ala Gln Val Ser
 180 185 190

Ile Gly Lys Gln Trp Lys Gln Phe Leu Asp Tyr Ser Asp Ser Val Gly
 195 200 205

Phe Ile Phe His Asp Asp Ala Lys Arg Leu Asp Arg Asn Ala Lys Asn

210

215

220

Arg Tyr Thr Val

225

<210> 8

<211> 228

<212> PRT

<213> Pimiento sp

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)..(228)

<223> Séquence d'acides aminés issue de la traduction de la séquence
codante de eIF4E

Génotype Yolo Y porteur de l'allèle de résistance pvr21

<400> 8

Met Ala Thr Ala Glu Met Glu Lys Thr Thr Thr Phe Asp Glu Ala Glu

1

5

10

15

Lys Val Lys Leu Asn Ala Asn Glu Ala Asp Asp Glu Val Glu Glu Gly

20

25

30

Glu Ile Val Glu Glu Thr Asp Asp Thr Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Glu

35

40

45

Ile Ala Thr Lys His Pro Leu Glu His Ser Trp Thr Phe Trp Phe Asp

50

55

60

Asn Pro Glu Ala Lys Ser Lys Gln Ala Ala Trp Gly Ser Ser Arg Arg

65

70

75

80

Asn Val Tyr Thr Phe Ser Thr Val Glu Asp Phe Trp Gly Ala Tyr Asn

85

90

95

Asn Ile His His Pro Ser Lys Leu Val Val Gly Ala Asp Leu His Cys
 100 105 110

Phe Lys His Lys Ile Glu Pro Lys Trp Glu Asp Pro Val Cys Ala Asn
 115 120 125

Gly Gly Thr Trp Lys Met Ser Phe Ser Lys Gly Lys Ser Asp Thr Ser
 130 135 140

Trp Leu Tyr Thr Leu Leu Ala Met Ile Gly His Gln Phe Asp His Glu
 145 150 155 160

Asp Glu Ile Cys Gly Ala Val Val Ser Val Arg Gly Lys Gly Glu Lys
 165 170 175

Ile Ser Leu Trp Thr Lys Asn Ala Ala Asn Glu Thr Ala Gln Val Ser
 180 185 190

Ile Gly Lys Gln Trp Lys Gln Phe Leu Asp Tyr Ser Asp Ser Val Gly
 195 200 205

Phe Ile Phe His Asp Asp Ala Lys Arg Leu Asp Arg Asn Ala Lys Asn
 210 215 220

Arg Tyr Thr Val
 225

<210> 9

<211> 32

<212> DNA

<213> Toute variété

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(28)

<223> Amorça de sequência codante eIF4E

<400> 9

tctagatatac ayaatatcca ycacccaagc aa

32

<210> 10

<211> 28

<212> DNA

<213> Toute variété

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(18)

<223> Amorce de séquence codante eIF4E

<400> 10

tctagatggg rgcagacttt caytggtt

28

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Pimiento sp

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(18)

<223> amorce de séquence codante eIF4E

<400> 11

gtatgagaaa ctaaacta

18

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Pimiento sp

<220>

<221> primer_bind
<222> (1)..(25)
<223> Amorce de séquence codante eIF4E

<400> 12
caacttttca gtacgaattg tgttt

25

<210> 13
<211> 25
<212> DNA
<213> Pimiento sp

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(25)
<223> Amorce de séquence codante eIF4E

<400> 13
tccgacattg catcaagaat tatac

25

<210> 14
<211> 18
<212> DNA
<213> Tomato sp

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(18)
<223> Amorce de séquence codante eIF4E

<400> 14
aatgagaaa ctaaacta

18

<210> 15
<211> 25

<212> DNA

<213> Tomato sp

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(25)

<223> Amorçe de séquence codante eIF4E

<400> 15

ctttccagta cgaattgtgt ttctt

25

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> Tomato sp

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(25)

<223> Amorçe de séquence codante eIF4E

<400> 16

ctgcatcaag aactatacgg tgtaa

25

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Pimiento sp

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(20)

<223> Amorçe sens de séquence codante eIF   Yolo Wonder et Yolo Y

<400> 17

aaaagcacac agcaccaaca

20

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> Pimiento sp

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(22)

<223> Amorce antisens de séquence codante eIF4 Yolo Wonder et Yolo Y

<400> 18

tattccgaca ttgcatcaag aa

22

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> Pimiento sp

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(24)

<223> Amorce Piml de séquence codante eIF4E de Yolo Wonder

<400> 19

agactttcat tgtttcaagc ataa

24

<210> 20

<211> 25

<212> DNA

<213> Pimiento sp

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(25)

<223> Amorça Pin4 de séquence condante eIF4E de Yolo Wonder

<400> 20

gattagaaag tgcaaacacc aatac

25



2835849

N° d'enregistrement
national

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 619105
FR 0201583

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
T	LELLIS A ET AL: "Loss-of-susceptibility mutants of Arabidopsis thaliana reveal an essential role for eIF(1s)4E during Potyvirus infection" CURRENT BIOLOGY, vol. 12, no. 12, 25 juin 2002 (2002-06-25), pages 1046-51, XP002217535 * le document en entier *	1-3	C12Q1/68 C12N15/29 C12N15/82 A01H1/04 A01H5/00 C07K16/16 C07K14/415 C07H21/00
A	WHITMAN S ET AL: "Selectable viruses and altered susceptibility mutants in Arabidopsis thaliana" PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 96, janvier 1999 (1999-01), pages 772-77, XP002217536 * le document en entier *	1	
A	LEONARD SIMON ET AL: "Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 74, no. 17, septembre 2000 (2000-09), pages 7730-7737, XP002176524 ISSN: 0022-538X * le document en entier *	1	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7) C12Q C12N A01H C07K
A	REVERS F ET AL: "NEW ADVANCES IN UNDERSTANDING THE MOLECULAR BIOLOGY OF PLANT/POTYVIRUS INTERACTIONS" MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS, APS PRESS, ST. PAUL, MN, US, vol. 12, no. 5, 1999, pages 367-376, XP001009714 ISSN: 0894-0282 * le document en entier *	1	
-/-			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
21 octobre 2002		Osborne, H	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

 1
EPO FORM 1503 12.99 (P44C14)



2835849

N° d'enregistrement
national

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 619105
FR 0201583

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	WO 99 43820 A (DU PONT ;ODELL JOAN T (US); OROZCO EMIL M JR (US)) 2 septembre 1999 (1999-09-02)	21-25	
A	* le document en entier *	17,18	
A	WO 01 40490 A (LALIBERTE JEAN FRANCOIS ;INST NAT RECH SCIENT (CA)) 7 juin 2001 (2001-06-07)		
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (int.C.L.7)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
21 octobre 2002		Osborne, H	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : antérieur—plan technologique O : divulgation non—écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

1
BPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

2835849

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0201583 FA 619105**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **21-10-2002**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9943820 A	02-09-1999	AU 2679699 A	15-09-1999
		BR 9907720 A	04-09-2001
		EP 1056863 A1	06-12-2000
		WO 9943820 A1	02-09-1999
WO 0140490 A	07-06-2001	AU 2131601 A	12-06-2001
		WO 0140490 A2	07-06-2001

EPO FORM P0486

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82